

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Jakub Soukup**

Retrocykliny

Retrocyclins

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Hana Španielová, PhD.

Praha, 2013

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 17. 05. 2013

Podpis

**Poděkování:**

Chtěl bych poděkovat RNDr. Haně Španielové, PhD. za cenné rady a připomínky při vypracování této práce. Zároveň bych chtěl poděkovat Nikol Vackové za pomoc s gramatickými úpravami a formátováním textu.

## Obsah:

Seznam zkratk:	V
Abstrakt	VII
1. Úvod	1
2. Výskyt defensinů	1
2.1 Výskyt $\alpha$ -defensinů	1
2.2 Výskyt $\beta$ -defensinů	3
2.3 Defensiny a jim podobné peptidy v organismech	4
2.4 Výskyt $\theta$ -defensinů (minidefensinů)	6
3. Vlastnosti defensinů	7
3.1 Vlastnosti $\alpha$ -defensinů	7
3.2 Vlastnosti $\beta$ -defensinů	8
3.3 Vlastnosti $\theta$ -defensinů	10
4. Retrocykliny	12
4.1 Objevení, struktura a syntéza retrocyklinů	12
4.2 Antivirové účinky	14
4.2.1 HIV	14
4.2.2 HSV	17
4.2.3 Virus chřipky	18
4.2.4 Virus horečky dengue	18
4.3 Antibakteriální aktivita	19
4.3.1 <i>Bacillus Anthracis</i>	19
4.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	19
4.3.3 <i>Gardnerella vaginalis</i>	20
4.4 Cytotoxicita	20
4.5 Produkce „přirozených“ retrocyklinů	22
4.5.1 Lidské buňky	22
4.5.2 Rostliny	22
4.5.3 Bakterie	22
4.6 Uměle vytvořené analogy retrocyklinů	23
5. Závěr	24
6. Literatura	25

## Seznam zkratek:

6HB	6-Helix Bundle domain	doména na gp41
BD	Big Defensin	velký defensin
BNBD	Bovine Neutrophil Beta Defensin	$\beta$ -defensin izolovaný z hovězích PMN
BV	Bacterial Vaginosis	bakteriální vaginóza
CCR5	Chemokine (C-C motif) Receptor type 5	buněčný receptor
CD4	Cluster of Differentiation 4	buněčný receptor
CR	Complement receptor	buněčný receptor
CS $\alpha\beta$	Cystein Stabilized alfa beta motif	cysteiny stabilizovaný alfa beta motiv
CXCR4 <sup>+</sup>	Chemokine (C-X-C motif) Receptor type 4	buněčný receptor
DEFA	Defensin Alfa gene	gen pro defensin alfa
DEFB	Defensin Beta gene	gen pro defensin beta
DEFT	Defensin Theta gene	gen pro defensin theta
DLP	Defensin Like Peptide	defensinům podobný peptid
DNA	Deoxyribonucleic Acid	deoxyribonukleová kyselina
DpVs	Diprovirins	diproviriny
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	kyselina ethylendiamintetraoctová
gB2	glycoprotein B2	obalový glykoprotein HSV
GFP	Green Fluorescence Protein	zelený fluorescenční protein
gp120	120-kDa glycoprotein	obalový glykoprotein HIV
gp160	160-kDa glycoprotein	prekurzor gp120 a gp41
gp41	41-kDa glycoprotein	obalový glykoprotein HIV
H3N2	HA subtype 3 NA subtype 2	typ viru chřipky
H5N1	HA subtype 3 NA subtype 2	typ viru chřipky
hBD	human Beta Defensin	lidský beta defensin
HD	Human Defensin	lidský defensin
HDEFA	Human Defensin Alfa gene	lidský gen pro defensin alfa
HIV	Human Immunodeficiency Virus	virus lidské imunitní nedostatečnosti

HMM	Hidden Markov Model	metoda srovnávání sekvencí
HNP	Human Neutrophil Peptide	$\alpha$ -defensin izolovaný z lidských PMN
HpVs	Hapivirins	hapiviriny
HS	Heparan Sulfate	heparan sulfát
HSV	Herpes Simplex Virus	virus Herpes Simplex
IC	Inhibition Concentration	inhibiční koncentrace
LF	Lethal Factor	enzymová komponenta toxinu <i>B. anthracis</i>
MCP	Macrophage Cationic Peptide	$\alpha$ -defensin izolovaný z králíčích makrofágů
mRNA	messenger Ribonucleic Acid	mediátorová ribonukleová kyselina
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	nukleární magnetická rezonance
NP	Neutrophil Peptide	$\alpha$ -defensin izolovaný z králíčích PMN
NS2B-NS3pro	Non-Structural protein 2B - Non Structural protein 3 serine protease	komplex nestrukturních proteinů viru horečky dengue
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells	periferní krevní mononukleární buňky
PG-1	Protegrin-1	prasečí cathelicidin
PMN	Polymorfonuclear neutrophil leukocyte	polymorfonukleární neutrofilní leukocyty
RC	Retrocyclin	retrocyklin
RTD	Rhesus Theta Defensin	$\theta$ -defensin izolovaný z makaka rhesus
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce
SP-D	Surfactant Protein D	Protein alveolárních buněk
Sh1	<i>Stichodactyla helianthus</i> neurotoxin I	<i>Stichodactyla helianthus</i> neurotoxin I
SIV	Simian Immunodeficiency Virus	virus opičí imunitní nedostatečnosti
SIVcpz	Simian Immunodeficiency Virus chimpanzees	virus opičí imunitní nedostatečnosti šimpanzů
SPR	Surface Plasmon Resonance	povrchová plasmonová rezonance
TAP	Tracheal Antimicrobial Peptide	tracheální antimikrobiální peptid
VLY	Vaginolysin	vaginolysin

## Abstrakt

Defensiny jsou peptidy s antimikrobiální, antifungální a antivirovou aktivitou. Defensiny se pravděpodobně vyskytují u všech druhů obratlovců. Existují tři podrodiny defensinů -  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\theta$ -defensiny.  $\alpha$ -defensiny existují pouze u savců a  $\theta$ -defensiny byly popsány pouze u makaků a paviánů, ale jejich geny se vyskytují v genomech všech opic starého světa kromě podčeledi *Homininae*. U lidí k produkci  $\theta$ -defensinů nedochází, kvůli předčasnému stop kodonu v jejich kódující sekvenci. Nicméně lidské  $\theta$ -defensiny byly vyrobeny synteticky *in vitro* a pojmenovány retrocykliny. Retrocykliny si zachovávají nejen antimikrobiální aktivitu, ale vykazují i neobvyklou aktivitu antivirovou. Retrocykliny úspěšně chrání buňky před infekcí HIV, HSV, chřipky a viru horečky dengue bez detekovatelné cytotoxicity k hostitelským buňkám. Retrocyklin RC-101 je blízko klinickým testům jako mikrobicid, který zabraňuje heterosexuálnímu přenosu HIV-1.

Klíčová slova: retrocyklin,  $\alpha$ -defensin,  $\beta$ -defensin,  $\theta$ -defensin, HIV, HSV, antivirotika

## Abstract

Defensins are peptides with antimicrobial, antifungal and antiviral activity. Defensins are likely to occur in all vertebrate species. There are three subfamilies of defensins -  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\theta$ -defensins. The  $\alpha$ -defensins exists only in mammals and  $\theta$ -defensins were described only in macaques and baboons but their genes occur in genomes of all old world monkeys except *Homininae* subfamily. In humans no  $\theta$ -defensins are produces due to premature stop codon in their coding sequence. However, they were produced synthetically *in vitro* and named retrocyclins. Retrocyclins not only maintain antimicrobial activity - but also exhibit unusual antiviral activity. Retrocyclins successfully protect cells from HIV, HSV, influenza and dengue fever virus infections with no detectable cytotoxicity to host cells. Retrocyclin RC-101 is close to the clinical testing as microbicide to prevent heterosexual transmission of HIV-1.

Keywords: retrocyclin,  $\alpha$ -defensin,  $\beta$ -defensin,  $\theta$ -defensin, HIV, HSV, antivirals

# 1. Úvod

Defensiny jsou peptidy o velikosti 4-5 kDa. Svůj název získaly díky tomu, že mají velký antimikrobiální, antifungální a antivirový potenciál. Defensiny, nebo jejich ekvivalenty, jsou přítomny v rostlinách, u bezobratlých i u obratlovců. U obratlovců se zřejmě jako první vyskytly  $\beta$ -defensiny. U savců se z genů pro  $\beta$ -defensiny vyvinuly  $\alpha$ -defensiny. Před zhruba patnácti lety byl u druhu makak rhesus (*Macaca Mulatta*) objeven další typ defensinů, tzv.  $\theta$ -defensin. Tento defensin vznikl spojením a zkrácením dvou demidefensinů (mutovaných prekurzorů pro  $\alpha$ -defensiny) a jejich následnou cirkularizací.

U člověka byla nalezena mRNA pro  $\theta$ -defensiny obsahující předčasný stop kodon, který znemožňuje jejich tvorbu *in vivo*. Známá sekvence peptidu umožnila tento malý cyklický peptid vytvořit pomocí syntézy na pevné fázi. Tímto způsobem byl stvořen umělý lidský  $\theta$ -defensin, který byl pojmenován retrocyklin. Tento malý peptid má 18 aminokyselin, je cyklický a obsahuje 6 cysteinů, spojených třemi disulfidickými vazbami. Retrocykliny ( $\theta$ -defensiny) úspěšně potlačují růst gram-negativních bakterií, gram-pozitivních bakterií i hub stejným způsobem jako  $\alpha$ -defensiny, nicméně fungují i v prostředí, které  $\alpha$ -defensiny inhibuje. Jsou schopné také inhibovat některé toxiny, které jsou produkovány patogeny. Retrocykliny úspěšně zabraňují vstupu virových částic do hostitelské buňky při infekci viru HIV-1, chřipky typu A nebo viru Herpes simplex.

Tato práce stručně shrnuje informace o  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\theta$  defensinech a zaměřuje se na jejich výskyt u různých organismů z hlediska evoluce antimikrobiálních strategií v boji proti patogenům. Hlavním úkolem této práce je však shromáždit poznatky o retrocyklinech, evolučně umlčených  $\theta$ -defensinech, které mají výjimečnou antivirovou aktivitu a poukázat na jejich možné využití v medicíně.

## 2. Výskyt defensinů

### 2.1 Výskyt $\alpha$ -defensinů

Patterson-Delafield s kol. (1980) zjistili, že v plicích makrofázích králíka jsou neznámé vysoce pozitivně nabitě baktericidní proteiny. V roce 1983 byly tyto proteiny identifikovány jako malé peptidy o hmotnosti zhruba 4 kDa a bohaté na arginin a cystein. Podle jejich místa objevu a celkového náboje byly pojmenovány Macrophage Cationic Peptide: MCP-1 a MCP-2. Oba peptidy se lišily pouze jednou substitucí argininu (Selsted et al., 1983).



Již dříve Zeya a Spitznagel (1968) našli pozitivně nabité proteiny s baktericidní aktivitou v králičích granulocytech. Na základě tohoto objevu se Selsted s kol. (1984) rozhodli hledat v granulocytech peptidy podobné MCP. Takové peptidy se jim opravdu podařilo nalézt. Byly pojmenovány NP (Neutrophil Peptide), s číslováním udávajícím jejich pohyblivost v gelu odvozenou od míry pozitivního náboje, tedy NP-1 s nejvyšší pohyblivostí, NP-2, NP-3a, NP-3b, NP-4 a NP-5 s nejnižší pohyblivostí. Všechny tyto peptidy mají antimikrobiální aktivitu (Selsted et al., 1984). Selsted s kol. (1985a) zjistili, že peptidy MCP-1 a NP-1 jsou identické a MCP-2 a NP-2 jsou také identické.

Další hledání těchto peptidů se přesunulo k lidským buňkám, konkrétně do polymorfonukleárních neutrofilních leukocytů (PMN). Zde byly objeveny peptidy patřící do stejné rodiny - peptidy HNP (Human Neutrophil Peptide). Stejně jako v předchozím případě byly tyto peptidy označeny podle jejich pohyblivosti v gelu jako HNP-1, HNP-2 a HNP-3. Tato rodina peptidů byla označena jako defensiny (Ganz et al., 1985). Později po objevu tzv.  $\beta$ -defensinů, začaly být tyto původní defensiny označovány jako „klasické defensiny“ a později jako  $\alpha$ -defensiny.

Kromě leukocytů byly  $\alpha$ -defensiny nalezeny také v epiteliálních Panethových buňkách v lidském střevě. Jones a Bevins (1992) našli gen pro HD-5 (Human Defensin) pomocí vysoce konzervované signální sekvence, proti které použili 5' oligonukleotid jako sondu. Předpokládalo se, že  $\alpha$ -defensiny jsou typické pouze pro nadřád *Euarchontoglires*<sup>1</sup> (pokusy o nalezení  $\alpha$ -defensinů u krávy nebo psa selhaly). Savčí genomový projekt umožnil hledat defensiny pomocí sekvenčních studií. Pomocí HMM (Hidden Markov Model) se Lynn a Bradley (2007) zaměřili na hledání  $\alpha$ -defensinů ve dvou nadřádech placentálů - *Xenarthra* a *Afrotheria*. Geny pro  $\alpha$ -defensiny byly identifikovány u slona, bodláka a pásavce. Zajímavé je, že gen pro  $\alpha$ -defensin byl nalezen i u vačice. To napovídá tomu, že  $\alpha$ -defensiny vznikly ještě před divergencí placentálů a vačnatců (cca před 130 mil. let). U některých savců dosud  $\alpha$ -defensiny nebyly objeveny. Je jen otázkou, jestli u některých savců  $\alpha$ -defensiny nezanikly. To by mohlo být způsobeno přítomností jiných antimikrobiálních peptidů, jako například kathericidinů<sup>2</sup>. Člověk má pouze jeden gen pro kathericidin a mnoho pro  $\alpha$ -defensiny, naproti tomu kráva geny pro  $\alpha$ -defensiny nemá žádné, ale má 11 genů pro kathericidiny. Sekvence podobná ge-

---

<sup>1</sup> skupina savců, která zahrnuje například primáty nebo hlodavce

<sup>2</sup> Kathericidiny jsou antimikrobiální peptidy v cytoplazmatických granulech savčích neutrofilů. V buňce jsou ukládány jako prekurzory (Lehrer and Ganz, 2002a).

nům pro  $\alpha$ -defensiny byla také nelezena v nadřádu *Laurasiatheria*<sup>3</sup>, konkrétně u koně (Looft et al., 2006).

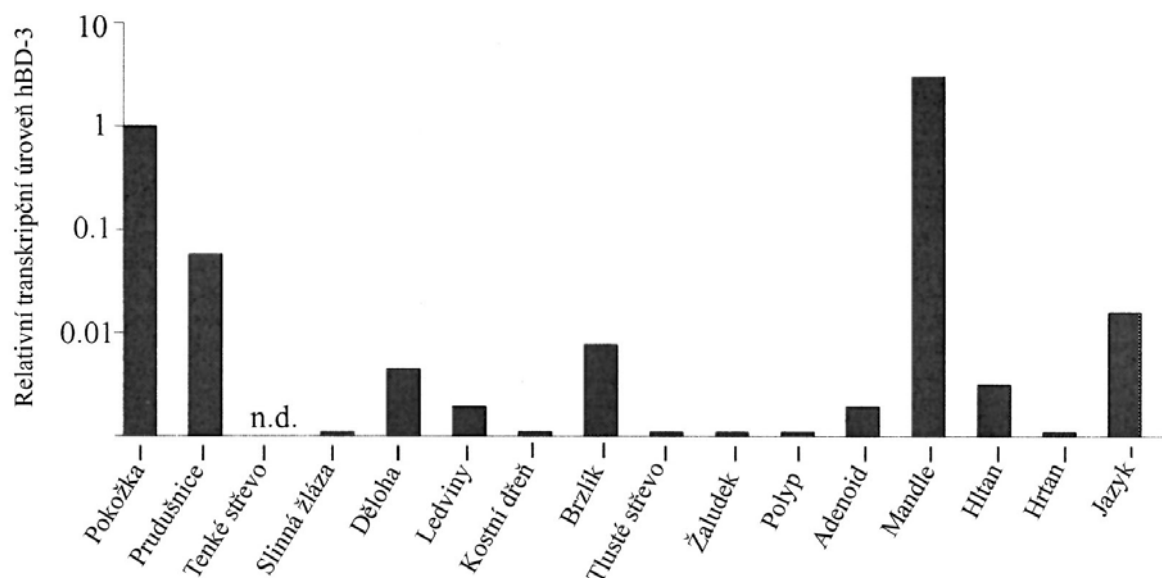
## 2.2 Výskyt $\beta$ -defensinů

$\beta$ -defensiny byly objeveny náhodně při hledání klasických ( $\alpha$ ) defensinů u přežvýkavců. Hledání se zaměřilo na peptidy s antimikrobiálními účinky o nízké molekulární hmotnosti obsahující cysteiny v neutrofilech bohatých na granule. Nicméně žádné klasické defensiny nalezeny nebyly. Namísto toho byly nalezeny peptidy, které mají podobnou velikost, celkový pozitivní náboj a jsou zde přítomny tři intramolekulární disulfidické můstky. Peptidy se ale lišily v primární struktuře, proto byly pojmenovány  $\beta$ -defensiny. Těchto peptidů bylo nalezeno v bovinních neutrofilech celkem 13 a byly označeny BNBD (Bovine Neutrophil Beta Defensin) 1-13 (Selsted et al., 1993). Kromě bovinních PMN defensinů, byly  $\beta$ -defensiny izolovány z bovinní tracheální sliznice a pojmenovány TAP (Tracheal Antimicrobial Peptide) (Diamond et al., 1991). Hybridizace cDNA TAP s mRNA izolovanou z různých tkání naznačuje, že TAP jsou na rozdíl od jiných defensinů exprimovány nejen v PMN, ale i v epitelálních buňkách (Diamond et al., 1993).

V kuřecích PMN byly také nalezeny  $\beta$ -defensiny, které byly pojmenovány jako gallinaciny (Harwig et al., 1994). To napovídá tomu, že  $\beta$ -defensiny, nebo jejich předchůdci, existovaly ještě před diverzifikací ptáků a savců před více jak 220 miliony let (Lehrer and Ganz, 2002b). U lidí byly objeveny celkem čtyři  $\beta$ -defensiny označované jako hBD (human Beta Defensin) 1-4. Lidský  $\beta$ -defensin 1 byl izolován z lidského hemofiltrátu (Bensch et al., 1995). Gen pro tento defensin byl později nalezen pomocí in situ hybridizace v ledvinách (epiteliální vrstvě Henleyovy kličky, distálních tubulech a sběrných kanálcích), v ženském genitálním traktu a pomocí RT-PCR v dalších epitelálních tkáních (Valore et al., 1998). Další lidské  $\beta$ -defensiny hBD-2 a hBD-3 byly izolovány z pokožky člověka trpícího svrabem. V dalších orgánech byly nalezeny mRNA pro hBD-2 a hBD-3 (Harder et al., 1997; Harder et al., 2001). Míra exprese mRNA pro hBD-3 je znázorněna v grafu 1. Lidský  $\beta$ -defensin 4 byl objeven pomocí analýzy genomické sekvence na chromozomu 8p23. Po nalezení sekvence DNA, tedy i aminokyselinové sekvence, byl hBD-4 nasyntetizován k určení antimikrobiální a antifungální aktivity. Při lokalizačních pokusech byla jeho nejvyšší exprese zjištěna ve varlatech (Garcia et al., 2001b).

---

<sup>3</sup> Skupina placentálů původem z kontinentu Laurasie, zahrnuje například netopýry, kopytníky, rejsky nebo velryby.

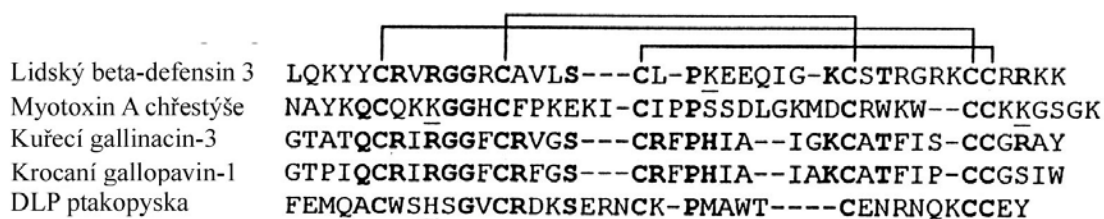


Graf 1: Míra exprese hBD-3 v jednotlivých tkáních. Nejvyšší transkripční úroveň hBD-3 je v pokožce a v mandlích. Sloupce ukazují relativní transkripční úroveň normalizovanou na úroveň exprese  $\beta$ -aktinu. n.d. značí nedetekovatelné množství. Převzato a upraveno z (Harder et al., 2001).

### 2.3 - Defensiny a jim podobné peptidy v organismech

Nalezení  $\beta$ -defensinů u ptáků a u savců napovídá tomu, že by se další peptidy podobné  $\beta$ -defensinům mohly najít i u plazů a dalších obratlovců a dokonce i u bezobratlých organismů.

Defensinům podobné peptidy (DLP - Defensin Like Peptide) byly objeveny u ptáka pyska. Zajímavostí je, že byly nalezeny v jeho jedu a mají v něm majoritní zastoupení. I když mají DLP velikost 5 kDa sdílí zřetelné strukturní uspořádání s BNBD-12, navíc mají stejné párování cysteinů jako  $\beta$ -defensiny (Torres et al., 2000). U chřestýšů existují 2 jedy - Krotamin a Myotoxin A, které si jsou podobné. Oba jedy jsou příbuzné  $\beta$ -defensinům a mají i stejné párování cysteinů (Fox et al., 1979). Podobnost DLP, myotoxinu A a  $\beta$ -defensinů je uvedena na obrázku 1. Pomocí genomické analýzy bylo nalezeno 7 genů homologních k  $\beta$ -defensinům v kostnatých rybách (Zou et al., 2007).

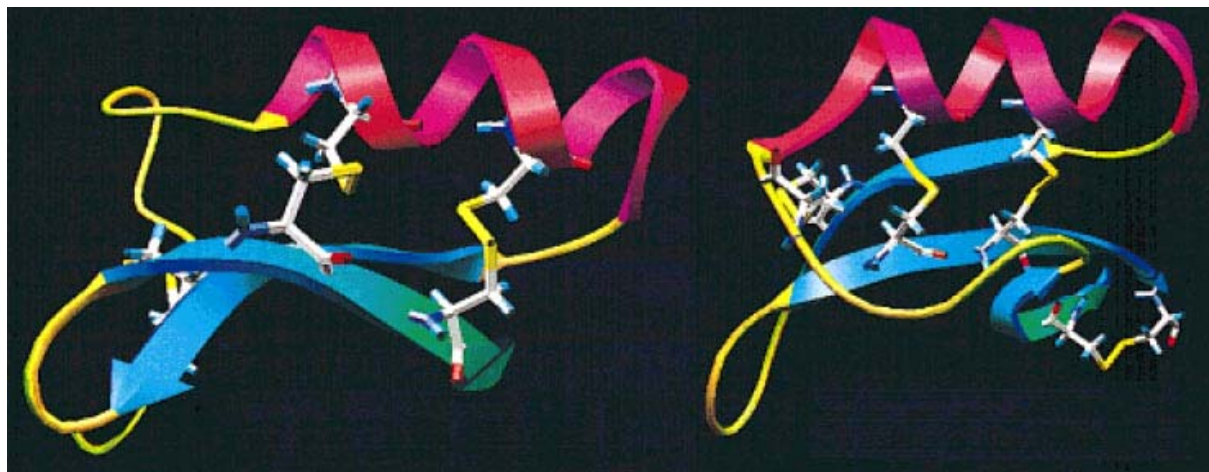


Obrázek 1: Srovnání sekvence hBD-3, myotoxinu A chřestýše, kuřecího gallinacinu-3, krocaního gallopavinu-1 a DLP ptakopyska. K dosažení maximální podobnosti byly vloženy mezery do sekvencí. Na vrchu je znázorněná konektivita cysteinů, která je ve všech pěti peptidech zachována. Převzato a upraveno z (Zhao et al., 2001).

U hmyzu byly také nalezeny defensiny. Nejprve byly považovány za homologní k savcům, nicméně strukturální studie to nepotvrdily. Mají 29-34 aminokyselin s konzervovanými cysteiny, ale jejich párování je odlišné od párování cysteinů u  $\alpha$  a  $\beta$  defensinů. Jejich terciární strukturu (zobrazena na obrázku 2) tvoří trojitě skládané antiparalelní  $\beta$ -listy s centrálním  $\alpha$ -helixem, stabilizovaným disulfidickými můstky (CS $\alpha\beta$  motiv - cysteine-stabilized  $\alpha\beta$  motif). Tyto defensiny jsou aktivní proti gram-pozitivním bakteriím. Hmyzí defensiny jsou homologní v hmyzím řádu, ale ne napříč řády. Existují i u nejstarších řádů jako je například řád *Odonata*. Shrnuto v (Otvos, 2000). BD neboli Big Defensin, který byl objeven u ostrorepa (*Tachypleus tridentatus*), je peptid, který má 79 aminokyselin a 3 disulfidické můstky (se stejným motivem jako u  $\beta$ -defensinů). Pozoruhodný je fakt, že 37 aminokyselin na C konci BD odpovídá potkanímu NP-2 defensinu. BD má jak antibakteriální aktivitu, tak antifungální. Na gram-negativní bakterie je efektivnější C konec BD, zatímco na gram-pozitivní je účinnější N konec BD (Saito et al., 1995). U sasanky (*Stichodactyla helianthus*) se vyskytuje neurotoxin I (Sh1), který má strukturu podobnou  $\beta$ -defensinům (Fogh et al., 1990). U dalších sasank jsou homologní peptidy k Sh1. I další bezobratlí mají své peptidy podobné defensinům, například slávka středomořská (*Mytilus galloprovincialis*) (Hubert et al., 1996), nebo kreveta (*Penaeus vannamei*) (Destoumieux et al., 1997).

Peptidy s podobou strukturou jako defensiny byly objeveny i v rostlinách, kde byly také pojmenovány jako defensiny. Rostlinné defensiny jsou zřejmě přítomné v celé říši rostlin, kde mají délku 45-54 aminokyselin. Jejich primární struktura zřejmě souvisí s antibakteriální aktivitou a podle antibakteriální aktivity byly rostlinné defensiny rozděleny do 4 skupin. Všechny skupiny mají 8 konzervovaných cysteinů, které tvoří disulfidické můstky. Zarážející je podobnost terciární struktury (zobrazena na obrázku 2) skupiny 3 a 4 s hmyzími defensiny. Shrnuto v (Garcia-Olmedo et al., 1998). Dimarcq s kolektivem (1998) připouští, že hmyzí a rostlinné defensiny by mohly mít společné předky. Nicméně defensiny s motivem CS $\alpha\beta$  neby-

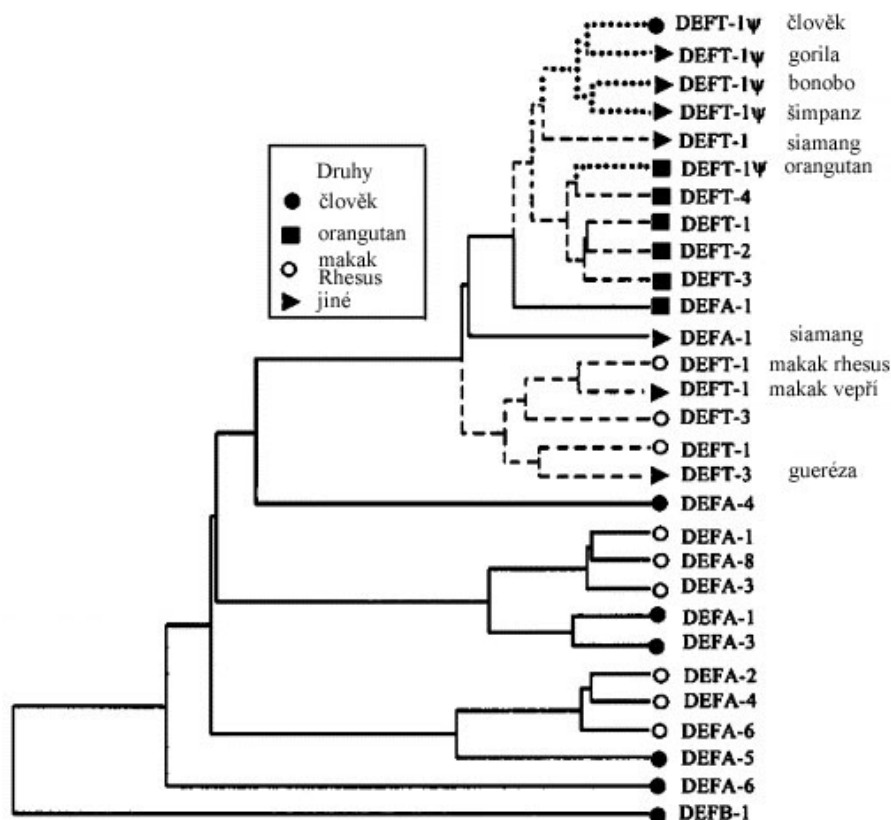
ly u obratlovců nalezeny. U živočichů se setkáváme spíše s motivem antiparalelního  $\beta$ -listu ve vlásence (tato struktura je více popsána v kapitole 3)



Obrázek 2: Terciární struktura hmyzích a rostlinných defensinů. Vlevo je zobrazen hmyzí defensin a vpravo rostlinný defensin. Převzato a upraveno z (Dimarcq et al., 1998).

## 2.4 Výskyt $\theta$ -defensinů (minidefensinů)

Další a zatím poslední typ defensinů byl objeven u makaka rhesus (*Macaca mullata*). Tento defensin je 18 aminokyselin dlouhý a cyklický. Byl pojmenován  $\theta$ -defensin (řecké písmeno theta má vizuální podobu se sekundární strukturou  $\theta$ -defensinů) a někdy bývá označován jako minidefensin (Tang et al., 1999). U makaka rhesus existuje šest  $\theta$ -defensinů označovaných jako RTD (Rhesus Theta Defensin) (Tongaonkar et al., 2011). Geny pro  $\theta$ -defensiny byly objeveny i u dalších primátů. Tyto geny mají pouze opice starého světa, opice nového světa je nemají. Fylogeneze genů pro  $\theta$ -defensiny je zobrazena v dendrogramu na obrázku 3. U některých zástupců opic starého světa byly tyto geny umlčeny předčasným stop kodonem (Nguyen et al., 2003).



Obrázek 3: Fylogeneze genů pro  $\theta$ -defensiny. Na dendrogramu jsou  $\alpha$ -defensiny (plné čáry),  $\theta$ -defensiny (čárkované čáry) a umlčené  $\theta$ -defensiny (tečkované čáry). Převzato a upraveno z (Nguyen et al., 2003).

### 3. Vlastnosti defensinů

#### 3.1 Vlastnosti $\alpha$ -defensinů

Primární struktura  $\alpha$ -defensinů obsahuje 32-34 aminokyselin a je bohatá na arginin a cystein. Počet argininů v jejich struktuře určuje jejich náboj. Všechny  $\alpha$ -defensiny obsahují 6 cysteinů, které jsou konzervovány. Porovnání lidských a králíčích  $\alpha$ -defensinů je zobrazeno na obrázku 4 (Selsted et al., 1985a; Selsted et al., 1985b). Tyto cysteiny tvoří 3 disulfidické můstky, v  $\alpha$ -defensinech se vždy párují cysteiny 1-6, 2-4 a 3-5 (Selsted and Harwig, 1989). Sekundární strukturu tvoří  $\beta$ -vlásenka s  $\beta$ -listem, ve kterém jsou tři antiparalelní  $\beta$ -vlákna. Okolo 18. aminokyseliny se tvoří  $\beta$ -výduť. Přítomnost  $\beta$ -výduti může znamenat, že  $\alpha$ -defensiny mohou tvořit dimery (Pardi et al., 1992; Zhang et al., 1992).

Člověk	HNP-1	A	C	Y	C	R	I	P	A	C	I	A	G	E	R	R	Y	G	T	C	I	Y	Q	G	R	L	W	A	F	C	C				
	HNP-2		C	Y	C	R	I	P	A	C	I	A	G	E	R	R	Y	G	T	C	I	Y	Q	G	R	L	W	A	F	C	C				
	HNP-3	D	G	Y	C	R	I	P	A	C	I	A	G	E	R	R	Y	G	T	C	I	Y	Q	G	R	L	W	A	F	C	C				
Králik	NP-1	V	V	C	A	C	R	R	A	L	C	L	P	R	E	R	R	A	G	F	C	R	I	R	G	R	I	H	P	L	C	C	R	R	
	NP-2	V	V	C	A	C	R	R	A	L	C	L	P	L	E	R	R	A	G	F	C	R	I	R	G	R	I	H	P	L	C	C	R	R	
	NP-3a	G	I	C	A	C	R	R	R	F	C	P	N	S	E	R	F	S	G	Y	C	R	V	N	G	A	R	Y	V	R	C	C	S	R	R
	NP-3b	G	R	C	V	C	R	K	Q	L	L	C	S	Y	R	E	R	R	I	G	D	C	K	I	R	G	V	R	F	P	F	C	C	P	R
	NP-4	V	S	C	T	C	R	R	F	S	C	G	F	G	E	R	A	S	G	S	C	T	V	N	G	V	R	H	T	L	C	C	R	R	
	NP-5	V	F	C	T	C	R	G	F	L	C	G	S	G	E	R	A	S	G	S	C	T	I	N	G	V	R	H	T	L	C	C	R	R	

Obrázek 4: Sekvenční porovnání lidských a králičích  $\alpha$ -defensinů. Převzato a upraveno z (Selsted et al., 1985b).

Podrodina  $\alpha$ -defensinů má baktericidní aktivitu na gram-pozitivní i gram-negativní bakterie, dále má i antifungální aktivitu a antivirovou aktivitu. Každý  $\alpha$ -defensin se ve své aktivitě na určité patogeny liší a je citlivý na vysoké koncentrace solí a hodnotu pH. Ideální hodnota pH je pro ně 7-8 (existují  $\alpha$ -defensiny funkční i v nižším pH) (Ganz et al., 1985; Selsted et al., 1984).

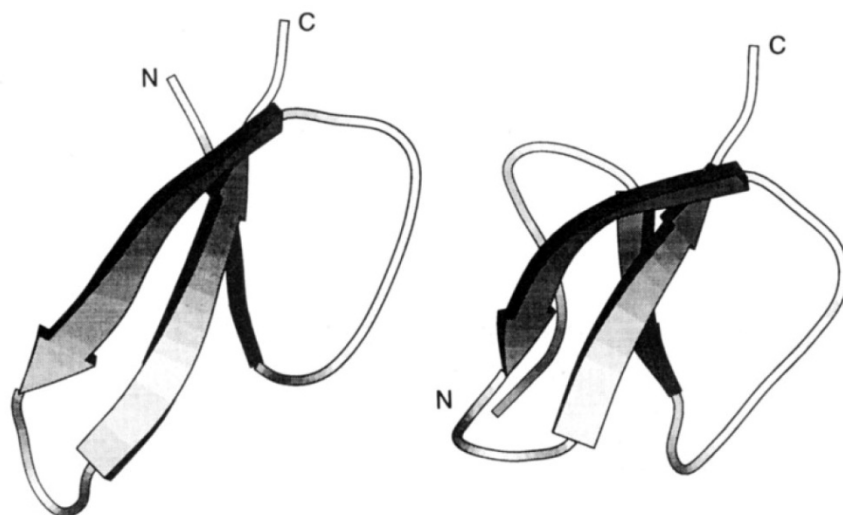
HNP-1, HNP-3 a HD-5 jsou atraktantem pro makrofágy a velmi slabě pro dendritické buňky. Tyto tři defensiny jsou také atraktantem pro T-lymfocyty (jak naivní, tak paměťové) a také pro žírné buňky. Všechny tyto buňky mají společný konzervovaný receptor pro  $\alpha$ -defensiny a ty by tak mohly hrát roli při imunomodulaci těchto buněk (Grigat et al., 2007).

Geny pro  $\alpha$ -defensiny se označují DEFA (podle HUGO/GDB) a geny pro lidské  $\alpha$ -defensiny se označují jako HDEFA. Geny pro HNP 1-4 (HDEFA 1-4) se nacházejí na chromozomu 8p23 (Palfree et al., 1993; Sparkes et al., 1989) a geny pro HD 5 a 6 (HDEFA 5 a 6) se nacházejí na chromozomu 8p21-pteru, který obsahuje region p23 (Bevins et al., 1996). Bevins s kol. (1996) navrhuje i evoluční proces pro vznik genů pro HNP. Gen pro antický myeloidní  $\alpha$ -defensin vznikl z meiotického křížení HDEFA 5 a 6 a následná duplikace dala vznik genům HDEFA 1 a 4.

### 3.2 Vlastnosti $\beta$ -defensinů

Primární struktura  $\beta$ -defensinů je tvořena 38-42 aminokyselinami. Stejně jako v  $\alpha$ -defensinech, mají  $\beta$ -defensiny 6 cysteinů, které jsou spojené disulfidickými můstky (Selsted et al., 1993).  $\beta$ -defensiny mají jiné párování cysteinů. Zatímco  $\alpha$ -defensiny tvoří disulfidické můstky mezi cysteiny 1-6, 2-4 a 3-6,  $\beta$ -defensiny tvoří disulfidické můstky mezi cysteiny 1-5, 2-4 a 3-6 (Tang and Selsted, 1993). Sekundární strukturu  $\beta$ -defensinů tvoří

$\beta$ -vlásenka s antiparalelním  $\beta$ -listem ve kterém jsou 3  $\beta$ -vlákna. Je možné, že se tvoří i čtvrté  $\beta$ -vlákno na N-konci defensinu. I  $\beta$ -defensiny mají ve své struktuře  $\beta$ -výduť. Přítomnost  $\beta$ -výduti naznačuje, že stejně jako  $\alpha$ -defensiny mohou  $\beta$ -defensiny tvořit dimery. Terciární struktura  $\alpha$  a  $\beta$  defensinů je velmi podobná. I když se primární struktura liší, terciární struktura napovídá tomu, že obě podrodiny jsou evolučně příbuzné, protože terciární struktura diverguje pomaleji než struktura primární. (Matthews et al., 1981) Porovnání terciárních struktur  $\alpha$  a  $\beta$  defensinů je na obrázku 5 (Zimmermann et al., 1995).



Obrázek 5: Řešení 3D struktury BNBD-12 (vpravo) a NP-2 (vlevo). Převzato (Zimmermann et al., 1995)

Podrodina  $\beta$ -defensinů je aktivní proti gram-negativním bakteriím, gram-pozitivním bakteriím i houbám. Lidské  $\beta$ -defensiny 1 a 2 jsou aktivní pouze proti kvasinkám a gram-negativním bakteriím. Na rozdíl od HNP jsou funkční i v nízkém pH (pH 5,5), ale jsou stejně citlivé na koncentraci solí (Harder et al., 1997; Valore et al., 1998). Lidský  $\beta$ -defensin 3 je aktivní i proti gram-pozitivním bakteriím, doplňuje tak hBD 1 a 2, které proti nim aktivní nejsou. Proti gram-pozitivním bakteriím má hBD-3 stejný účinek jako penicilin - tedy poškozuje buněčnou stěnu.

Stejně jako  $\alpha$ -defensiny, také  $\beta$ -defensiny fungují jako atraktanty. Konkrétně hBD 3 a 4 fungují jako atraktanty pro krevní monocyty. Mohou tak doplňovat  $\alpha$ -defensiny v této funkci (Garcia et al., 2001a; Garcia et al., 2001b).

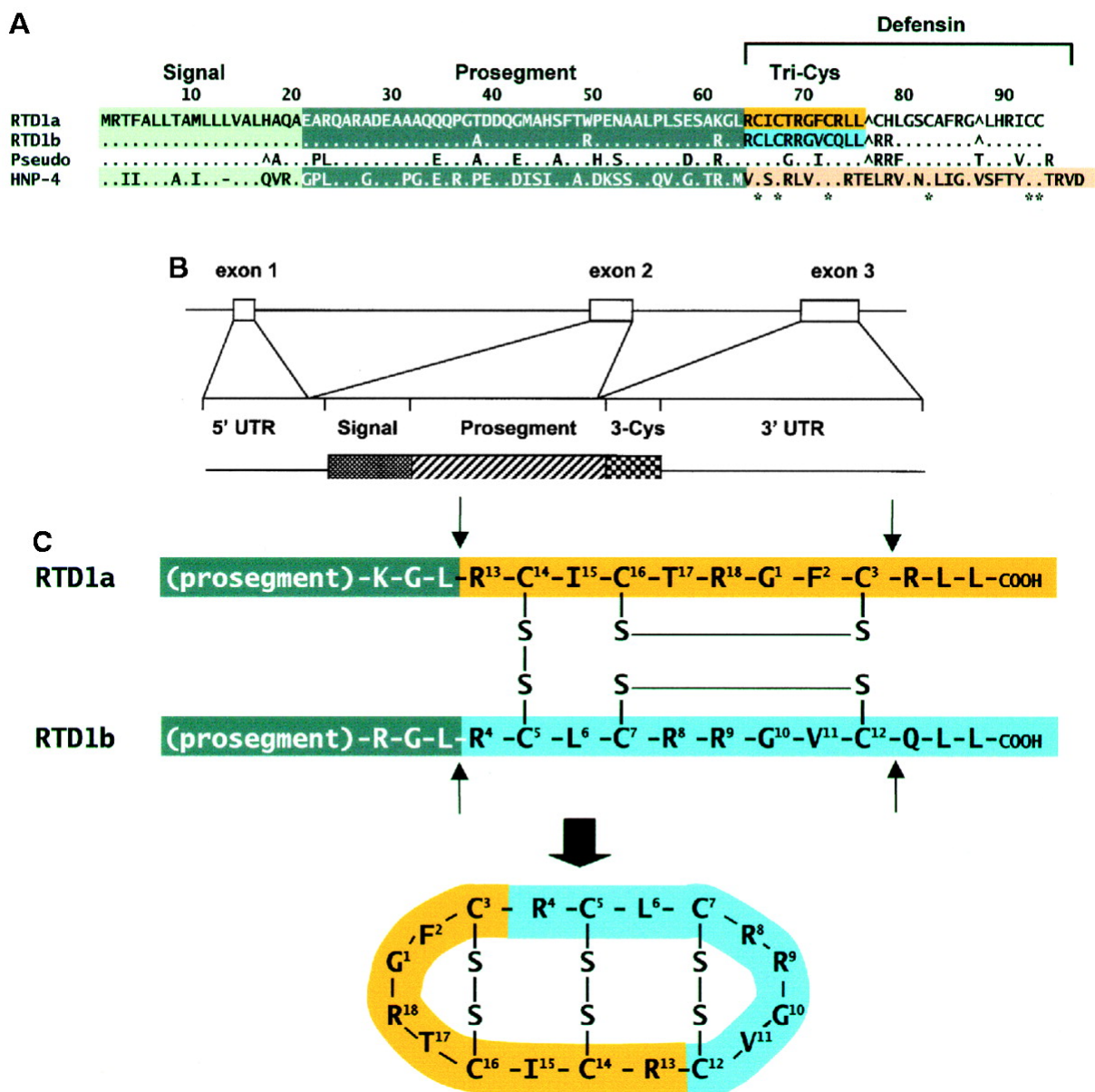
Geny pro lidské  $\beta$ -defensiny leží ve stejném regionu jako geny pro  $\alpha$ -defensiny. Gen pro hBD-1 leží 100-150 kb od shluku genů pro  $\alpha$ -defensiny, tedy na chromozomu 8p23. To by mohlo souviset s jejich evoluční příbuzností (Liu et al., 1997).



### 3.3 Vlastnosti $\theta$ -defensinů

Primární strukturu  $\theta$ -defensinů tvoří 18 aminokyselin. Obsahují 6 cysteinů, které v sekundární struktuře tvoří disulfidické můstky. Tyto defensiny jsou cyklické a vznikají spojením dvou molekul tzv. demidefensinů. Demidefensiny vznikají ze 76 aminokyselin dlouhých prekurzorů, které mají tři části - signální sekvenci (tu tvoří 20 aminokyselin), aminokyselinový prosegment (tvořen 44 aminokyselinami) a samotný demidefensin (12 aminokyselin). Při vzniku cyklického  $\theta$ -defensinu dochází k odštěpení tří aminokyselin z C konců demidefensinů a jejich následné ligaci ve směru „head-to-tail“. Znázornění aminokyselinových prekurzorů a struktury minidefensinu je uvedeno na obrázku 6 (Tang et al., 1999). Vznikne tak jeden  $\theta$ -defensin dlouhý 18 aminokyselin. Celkem byla u makaka potvrzena existence tří různých demidefensinů. Minidefensiny mohou být tvořeny buďto stejným párem demidefensinů nebo dvěma rozdílnými demidefensiny, proto Leonova s kol. (2001) navrhuje vzorec pro výpočet celkového počtu minidefensinů v organismu -  $n$  genů tvoří  $(n/2) \times (n+1)$  peptidů. Podle tohoto vzorce může existovat až šest RTD. Existenci všech šesti RTD potvrdil (Tongaonkar et al., 2011).

$\theta$ -defensiny jsou účinné proti gram-pozitivním bakteriím, gram-negativním bakteriím a houbám a ukazují se jako mnohem účinnější než  $\alpha$ -defensiny (Tongaonkar et al., 2011).  $\theta$ -defensiny působí velice podobně jako  $\alpha$ -defensiny, ale jsou rezistentní k vysokým koncentracím solí (150 mM). Tato rezistence zřejmě souvisí s velmi neobvyklou cyklickou strukturou. Pokud byla ve vysokých koncentracích solí testována uměle vytvořená acyklická forma RTD-1, ukázalo se, že je mnohem méně odolná než jako přirozená cyklická verze (Tang et al., 1999).



Obrázek 6: Sekvence prekurzorů  $\theta$ -defensinů a znázornění struktury  $\theta$ -defensinů. (A) Znázornňuje sekvenci prekurzorů RTD porovnanou s lidským pseudogenem pro  $\theta$ -defensiny a HNP-4. Tečky znázorňují identické aminokyseliny s RTD1a prekurzory, ^ označuje pozici stop kodonu. Sekvence RTD1a a RTD1b jsou dva různé demidefensiny. (B) Znázorňuje pozici exonů v genomu pro demidefensinový prekurzor. (C) Znázorňuje místa sestřihu demidefensinů, disulfidické můstky a cyklickou strukturu  $\theta$ -defensinu. Převzato z (Tang et al., 1999).

## 4. Retrocykliny

### 4.1 Objevení, struktura a syntéza retrocyklinů

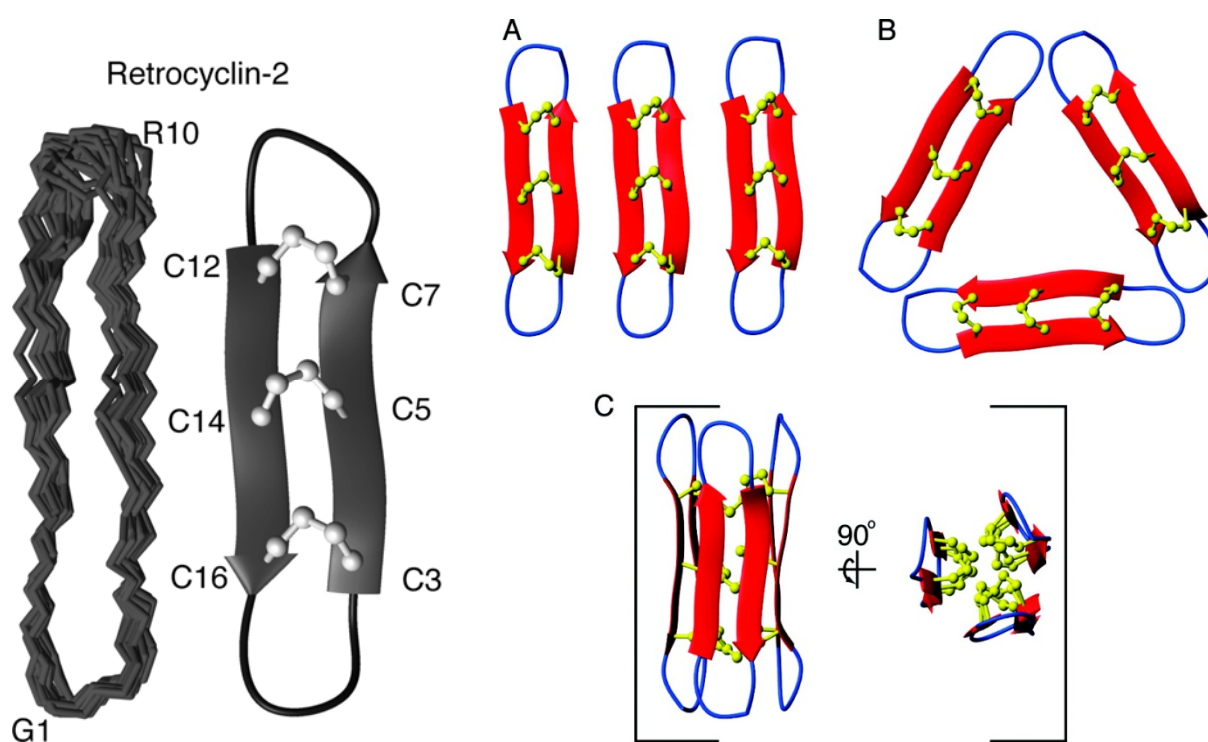
V lidském těle jsou přítomny dvě podrodiny defensinů a to  $\alpha$ -defensiny a  $\beta$ -defensiny. I když lidská DNA obsahuje geny pro  $\theta$ -defensiny, žádné  $\theta$ -defensiny nemáme. Lidské geny pro minidefensiny jsou z 88,9% identické jako u makaka rhesus, ale fakticky se však jedná o pseudogeny, neboť obsahují předčasný stop kodon. Člověk má nejméně šest DEFT pseudogenů, které jsou aktivně exprimovány, nicméně translace je předčasně ukončena. Mutace, která přerušuje tvorbu  $\theta$ -defensinů se vyskytla po divergenci *Homininae* a *Ponginae* (orangutani) (Nguyen et al., 2003). Známá sekvence DNA umožnila synteticky vytvořit lidský  $\theta$ -defensin, který byl nazván retrocyklin (retro - zpět v čase, cyklin - cyklická struktura) (Cole et al., 2002). Postupně byla vytvořena celá řada různě modifikovaných retrocyklinů (zobrazeny v tabulce 1), které se sekvenčně liší od tří základních typů - retrocyklinu-1, retrocyklinu-2 a retrocyklinu-3.

Číslo	Jméno	Komentáře	hmotnost <sub>p</sub> <sup>1</sup>	Sekvence
				1 3 5 6 8 10 11 13 15 16 18
RC-100	Retrocyclin-1	celkový náboj+4	1918.43	GICRC ICGRG ICRCI CGR
RC-101	K <sub>9</sub> -retrocyclin-1	R → K	1890.42	GICRC ICGKG ICRCI CGR
RC-102	Y <sub>6</sub> -retrocyclin-1	I → Y	1968.45	GICRC YCGRG ICRCI CGR
RC-103	Y <sub>15</sub> -retrocyclin-1	I → Y	1968.45	GICRC ICGRG ICRCY CGR
RC-104	Y <sub>2</sub> -retrocyclin-1	I → Y	1968.45	GYCRC ICGRG ICRCI CGR
RC-105	Y <sub>11</sub> -retrocyclin-1	I → Y	1968.45	GICRC ICGRG YCRCI CGR
RC-106	Y <sub>4</sub> -retrocyclin-1	R → Y	1882.39	GICYC ICGRG ICRCI CGR
RC-107	Y <sub>9</sub> -retrocyclin-1	R → Y	1882.39	GICIC ICGYG ICRCI CGR
RC-108	Y <sub>13</sub> -retrocyclin-1	R → Y	1882.39	GICIC ICGRG ICYCI CGR
RC-109	Y <sub>18</sub> -retrocyclin-1	R → Y	1882.39	GICIC ICGRG ICRCI CGY
RC-111	Retro-retrocyclin-1	Všechny L 18 → 1	1918.43	RGCIC RCIGR GCICR CIG
RC-112	Enantio-retrocyclin-1	Všechny D 1 → 18	1918.43	GICRC ICGRG ICRCI CGR
RC-113	Enantio-RC-101	Všechny D 1 → 18	1890.42	GICRC ICGKG ICRCI CGR
RC-114	K <sub>9</sub> , Y <sub>15</sub> -retrocyclin-1	R → K, I → Y	1940.43	GICRC ICGKG ICRCY CGR
RC-115	Y <sub>10</sub> -retrocyclin-1	G → Y	2024.56	GICRC ICGRY ICRCI CGR
RC-116	Y <sub>2</sub> -retrocyclin-1	I → Y	1968.45	RYICR CICGR GICRC ICG
RC-117	Y <sub>8</sub> -retrocyclin-1	G → Y	2024.56	GICRC ICYRG ICRCI CGR
RC-118	Y <sub>17</sub> -retrocyclin-1	G → Y	2024.56	GICRC ICGRG ICRCI CYR

Tabulka 1: Formy retrocyklinu-1. V komentářích jsou zobrazeny záměny aminokyselin. Sekvence je zobrazena od N konce k C konci. Všechny Enantio formy obsahují pouze D-aminokyseliny a Retro formy mají obrácené pořadí aminokyselin. <sup>1</sup> Průměrná hmotnost v Daltonech. Převzato a upraveno z (Wang et al., 2003)

Retrocyklin-1 (označován také jako RC-100, nebo RC-1) byl vytvořen pomocí syntézy peptidu na pevné fázi. Postsyntetické úpravy vyžadují oxidaci a cyklizaci. Syntetické retrocykliny vypadají jako  $\theta$ -defensiny s nefunkčním nebo vynechaným předčasným stop kodonem. Pro vytvoření hypotetického modelu retrocyklinu byla použita struktura protegrinu PG-1<sup>4</sup>, která byla následně zacyklována (Cole et al., 2002).

Struktura retrocyklinu-2 byla již určena na základě NMR (nukleární magnetická rezonance). Ukázalo se, že na rozdíl od  $\theta$ -defensinů je struktura retrocyklinu-2 velmi rigidní. To může být způsobeno tím, že struktura retrocyklinu-2 byla určena v micelech, které napodobovaly membránu, zatímco struktura  $\theta$ -defensinů byla určena ve vodném roztoku, kde retrocykliny tvoří trimery. Tvorba trimerů může souviset s jejich antivirovou aktivitou. Vlastní struktura retrocyklinu-2 je tvořena dvěma  $\beta$ -vláknými, které tvoří vlásenku. Cysteiny jsou uspořádány do „žebříkovité“ struktury uvnitř  $\beta$ -vlásenky. Struktura a formy trimerů jsou uvedeny na obrázku 7 (Daly et al., 2007).



Obrázek 7: Sekundární struktura a formy trimerů RC-2. Vlevo je zobrazena struktura RC-2. Šipkami jsou znázorněny  $\beta$ -vlákna na cyklické struktuře. Vpravo jsou 3 různé formy trimery retrocyklinu-2. Z toho C se jeví jako nejpravděpodobnější. Převzato a upraveno z (Daly et al., 2007)

<sup>4</sup> Protegrin-1 je prasečí cathelicidin, který má podobnou strukturu jako  $\theta$ -defensiny a má i podobnou aktivitu (Lehrer and Ganz, 2002a)

Retrocyklin je cyklický peptid, který nemá žádné postraní řetězce. Je tedy těžké ho radioaktivně nebo fluorescenčně označit. Z tohoto důvodu byl vytvořen modifikovaný RC-101, kde arginin nahrazuje lysin na pozici 9. Lysin zachovává celkový pozitivní náboj retrocyklinu a umožňuje přes  $\text{NH}_2$  skupinu navázat fluorescenční značku (Cole et al., 2002).

## 4.2 Antivirové účinky

Retrocykliny jsou intenzivně zkoumány hlavně díky tomu, že mají neobvyklý antivirový potenciál. Ten byl zkoumán při infekci HIV-1 (lidský virus imunitní nedostatečnosti), HSV (virus Herpes Simplex), virem chřipky A i virem horečky dengue.

### 4.2.1 HIV

Při vstupu HIV do buňky hraje roli obalový glykoprotein gp120, který se váže na receptor CD4 (Cluster of Differentiation 4). To způsobí konformační změnu v gp120, která vede k rozeznání receptorů CR (komplementový receptor), CXCR4 (chemokinový receptor typ 4) nebo CCR5 (chemokinový receptor typ 5). To umožní stabilnější navázání viru na buňku a obalový glykoprotein gp41 tak může proniknout k buněčné membráně, kde vytvoří fúzní pór (Blumenthal et al., 2012).

Při studiu v buněčných kulturách retrocykliny v koncentraci 10-20  $\mu\text{g/ml}$  poskytly kompletní ochranu  $\text{CD4}^+$  periferním krevním mononukleárním buňkám (PBMC - Peripheral Blood Mononuclear Cells) před virem HIV-1 (M-tropické i T-tropické kmeny<sup>5</sup>). RTD 1-3 také chrání buňky před HIV-1, ale ne v takové míře jako retrocykliny. Pokusy ukázaly, že retrocykliny neinhibují přímo virus, ale zřejmě působí během časně fáze infekce (navázání viru, pronikání viru do buňky) a blokuji tvorbu celé provirové DNA (Cole et al., 2002).

Retrocykliny se sice váží na virový gp120 a buněčný CD4 receptor, ale vazba na tyto glykoproteiny nezabraňuje vstupu viru do buňky. To bylo ukázáno v pokusu s buňkami, které měly na povrchu CD4 a CXCR4 nebo pouze CXCR4. Retrocyklin zabránil fúzi membrán v obou případech. Na retrocyklin-1 se váže gp41 ve stejném rozsahu jako gp120. Retrocyklin-1 se váže na domény v gp41, které tvoří 6HB (6-helix bundle domain) a zabráňuje tím tak fúzi membrán HIV a buňky (Gallo et al., 2006).

---

<sup>5</sup> U HIV se vyskytují tropismy M a T. M tropické kmeny napadají makrofágy a T tropické kmeny napadají hlavně pomocné T lymfocyty

Přesný mechanismus účinku retrocyklinů není zcela jasný, ale pomocí povrchové plasmonové resonance SPR (surface plasmon resonance) bylo zjištěno, že retrocykliny jsou lektiny, což jsou proteiny (peptidy), které s vysokou afinitou váží cukry. Ukázalo se, že retrocykliny se s vysokou afinitou váží na cukernou složku receptoru CD4 T lymfocytů, galaktosylceramid (primární receptor pro HIV-1 u T lymfocytů bez CD4) a na gp120. Pokud byly experimentálně zrušeny O nebo N glykosidické vazby na gp120, vazba retrocyklinů byla slabší. Když byly zrušeny obě glykosidické vazby, téměř žádné retrocykliny se na gp120 ne navázaly (Wang et al., 2004).

Ke studiu korelace mezi vazebnými a protekčními schopnostmi bylo použito několik verzí retrocyklinu, kde vždy jedna aminokyselina (mimo cysteinů) byla nahrazena tyrosinem (zobrazeno v tabulce 1). Tato studie potvrdila korelaci mezi těmito funkcemi (Wang et al., 2003). Stejně jako retrocykliny jsou  $\alpha$ -defensiny také lektiny. Ty blokují virus v době po vstupu do buňky a s retrocykliny ( $\theta$ -defensiny) by teoreticky mohly tvořit synergickou ochranu proti HIV-1. Podrodiny defensinů  $\alpha$  i  $\theta$  (retrocykliny) jsou značně ovlivněny přítomností séra v médiu a jejich aktivita proti HIV-1 velmi klesá, protože se váží na mnoho látek v séru. Jelikož defensiny potřebují okupovat minimálně 90% všech gp120 na povrchu viru a CD4 receptorů na povrchu buňky je nepravděpodobné, že budou úspěšně fungovat *in vivo*, pokud by nebyly přítomny v dostatečně vysoké koncentraci nebo pokud by nebyly využity lokálně. (Wang et al., 2004).

Stejně jako většina eukaryotických proteinů se i retrocyklin-1 skládá výhradně z L-aminokyselin. Je známo, že peptidy složené výhradně z D-aminokyselin, jsou rezistentnější k proteolytické degradaci. Shrnutí v (Van Regenmortel and Muller, 1998). D-aminokyselinový analog retrocyklinu-1 je RC-112, jehož aktivita proti HIV-1 byla také otestována. I když RC-112 má nižší afinitu k gp120 a CD4, jeho aktivita je značně vyšší (Owen et al., 2004a).

Byl navrhnout evoluční pokus pro prozkoumání možnosti, zdali si virus (HIV-1) může vytvořit rezistenci k retrocyklinům. Buňky byly kultivovány v přítomnosti viru HIV-1 a RC-101 sto dní. Koncentrace RC-101 2  $\mu\text{g/ml}$  použitá v pokusu není dostatečná k úplné inhibici HIV-1, tato koncentrace se postupně zvyšovala až na 10-20  $\mu\text{l/ml}$ . Po 25 dnech se objevily dvě aminokyselinové substituce ve virových glykoproteinech. Jedna na gp160<sup>6</sup>, kde došlo k záměně negativně nabitě kyseliny glutamové za pozitivně nabitý lysin a druhá na gp41 v místě, které zprostředkuje fúzi membrán (záměna glutaminu za arginin). Zajímavé je, že se

---

<sup>6</sup> gp160 je prekurzorem obalových proteinů HIV gp120 a gp41

nevyskytla mutace ve třech často mutujících variabilních smyčkách gp120. Třetí mutace se objevila 75 den na HR2 doméně gp41 a opět proběhla substituce za pozitivně nabitou aminokyselinu (asparagin za lysin). Třetí mutace způsobila, že RC-101 snížila virovou replikaci pouze o 30%. V reakci na tyto výsledky byla vytvořena mutanta HIV-1 uměle a otestována v přítomnosti RC-101. Také byla rezistentní. Velmi zajímavý je fakt, že tato mutanta nebyla schopná infikovat buňky bez přítomnosti RC-101 (Cole et al., 2006). Při pokračování této studie (až do dne 140) se neobjevila žádná další mutace. Zjistilo se *in silico*, které aminokyseliny (celkem šest) v gp41 se vážou na RC-101. Byla vytvořena mutanta, kde bylo všech šest aminokyselin vyměněno za pozitivně nabitě aminokyseliny a pozorovala se interakce s RC-101 *in silico*. Tato mutanta byla zcela rezistentní, ale *in vitro* nebyla vůbec infekční. Vznik rezistence vůči RC-101 je tedy u HIV-1 spojen se ztrátou schopnosti infikovat buňky. RC-101 má tedy jedinečný potenciál jako antivirotikum proti HIV-1, protože ke všem dosud známým antivirotikům si HIV-1 časem může vytvořit úplnou rezistenci (Fuhrman et al., 2007). Navíc, RC-101 dokáže inhibovat i mutanty, které si již vytvořily rezistenci k jiným klinicky používaným profylaktikům (Wood et al., 2013). HIV-2 je rezistentní k retrocyklinům, což mohlo být způsobeno tím, že HIV-2 se vyvinulo z SIV (opičí virus imunitní nedostatečnosti). Přirozený hostitel pro SIV jsou opice starého světa, které mají funkční  $\theta$ -defensiny. HIV-1 se vyvinulo z SIVcpz (SIV šimpanzů), ale šimpanzí nemají funkční  $\theta$ -defensin. HIV-2 se tedy mohl vyvinout za selekčních podmínek  $\theta$ -defensinů a vytvořit si tak rezistenci, zatímco HIV-1 tento selekční tlak neprodělalo (Cole et al., 2006).

RC-101 byl testován v modelu cervikální tkáně<sup>7</sup>. V tomto modelu se ukázalo, že RC-101 není cytotoxický a pokud je aplikován na apikální stranu buněk, neproniká do *lamina propria*. Přítomnost vaginální tekutiny nijak neovlivnila schopnost inhibovat HIV-1. Tato vlastnost dělá z RC-101 kandidáta lokálního mikrobicidu pro prevenci heterosexuálního přenosu HIV-1 (Cole et al., 2007). Později se RC-101 testoval *in vivo* u šesti samic makaků (*Macaca nemestrina*). Byl použit rychle se rozpouštějící film<sup>8</sup>, na který byl nanesen RC-101 spolu s pomocnými látkami. Pomocné látky nijak neovlivnily funkci retrocyklinů. Tyto filmy byly zavedeny do děložního hrdla (1 film/den po dobu 4 dnů). Zavedení filmů mělo minimální dopad na vaginální prostředí a filmy se rozpustily do 24 hodin po zavedení. Z děložního hrdla byly odebrány buňky, které se testovaly na přítomnost retrocyklinů. Retrocykliny byly při-

---

<sup>7</sup> Model byl složen z vaginální a ektocervikální epiteliální vrstvy s Langerhansovými buňkami (dendritické buňky). Tato vrstva byla podvrstvena PM1 buňkami (linie T-lymfocytů používaných pro studium HIV). Model doplnila *lamina propria*, která obsahovala fibroblasty. Povrch byl v kontaktu se vzduchem i médiem.

<sup>8</sup> Polymerický rychle se rozpouštějící vaginální film s polyvinylalkoholem a methylcelulósou

tomné i v odběrech z osmého dne. Aktivní retrocykliny byly nalezeny v biopsii děložního hrdla. Tkáň z biopsie se podrobila *ex vivo* testům na antivirovou aktivitu proti HIV-1. Biopsie, které byly *in vivo* ošetřeny RC-101 následně *ex vivo* produkovaly mnohem méně viru jak biopsie kontrolní (Cole et al., 2010).

Ukázalo se, že stabilní RC-101 může být přítomen i po 72 hodinách ve zdravé lidské vaginální tekutině. Biochemická analýza stability RC-101 ukázala, že je stabilní při 25°C a 37°C po dobu 13 dní, k degradaci je náchylný až okolo 65°C. Po dobu 10 dní je také stabilní v pH 3-7, ale při pH 12 rychle degraduje. V přítomnosti 3% peroxidu vodíku také rychle degraduje, ale v koncentracích 0,002% a 0,08% peroxidu vodíku (více biologicky relevantní koncentrace) je degradace mnohem pomalejší. Jako jediný účinný antioxidant se ukázala pouze EDTA (kyselina diamintetraoctová) (Sassi et al., 2011a). Při 40°C a relativní vlhkosti 75% byla ztráta RC-101 po 30 dnech 40%. I přes velkou ztrátu, je RC-101 stabilnější než většina proteinů a peptidů. Tato ztráta se dá zmenšit přidáním EDTA, která je ale cytotoxická při dlouhodobém vystavení cervikální tkáni. Pro IC<sub>90</sub><sup>9</sup> (Inhibitory Concentration) je pro tkáň *ex vivo* potřeba osmnáctkrát vyšší koncentrace než pro buňky *in vitro* (Sassi et al., 2011b). V orgánové kultuře cervikální tkáně se zjistilo, že vaginální ani semenné tekutiny nijak neovlivňují antivirovou aktivitu RC-101 proti HIV-1. RC-101 nezpůsobuje v této tkáni žádnou zánětlivou cytokinovou odpověď a úspěšně inhibuje přenos HIV-1 v cervikální sliznici (Gupta et al., 2012).

#### 4.2.2 HSV

Pro vstup HSV do buňky je důležité přichycení na buněčný povrch. Virus se navazuje na buněčný heparan sulfát pomocí glykoproteinů C (gC) a B (gB). Pro fúzi membrán je kriticky důležitý gB. Infektivita HSV bez gB je tak kompletně inhibována (Reske et al., 2007)

Retrocyklin-1 a retrocyklin-2 (také RTD-3) dokáží inhibovat také infekci HSV-1 a HSV-2, z toho nejvíce buňky chrání retrocyklin-2, který byl porovnán s HNP 1-3. Pokud byl retrocyklin-2 přidán k buněčné kultuře v čase navázání viru, byl schopen inhibovat infekci z 99%, zatímco HNP 1-3 nejvíce inhibovaly infekci, pokud byly přidány během vstupu virionů do buňky po jejich navázání. Retrocykliny se váží na obalové glykoproteiny HSV gB2. V afinitě retrocyklinů k gB2 hrají roli glykosidické vazby. Při odstranění O-glykosidických vazeb z gB2, se afinita retrocyklinů snížila a při odstranění N-glykosidických vazeb, se afinita

---

<sup>9</sup> IC<sub>90</sub> Potřebná koncentrace pro inhibici 90% viru



snížila velmi výrazně. Mechanismus účinku retrocyklinů při infekci HSV a HIV je pozoruhodně podobný, tkví v inhibici vstupu viru do buněk. (Yasin et al., 2004). To potvrzují i pokusy na myších, kdy HSV byl aplikován na poškozenou rohovku. Zjistilo se, že retrocyklin-2 inhibuje infekci, pouze pokud byl HSV preinkubován s retrocyklinem, nebo pokud byl retrocyklin aplikován na rohovku před infekcí. Pokud byl retrocyklin přidán po začátku infekce, neměl žádný účinek (Brandt et al., 2007).

#### 4.2.3 Virus chřipky

Retrocyklin-2 (RC2) inhibuje vstup virionů do buněk i v případě viru chřipky A. Konkrétně se zjistilo, že u viru chřipky A (H3N2) se jedná o blokování fúze membrán překřížením membránových glykoproteinů a jejich znehybněním při vstupu viru do buňky (Leikina et al., 2005b). Kromě toho retrocykliny (stejně jako HNP 1 a 2) indukují agregaci viru chřipky A. Fungují také jako opsoniny a zvyšují tak vychytávání viru chřipky A makrofágy a neutrofily. Na rozdíl od HNP 1-3 se retrocykliny neváží na SP-D (surfactant protein D)<sup>10</sup> (Doss et al., 2009). Účinek retrocyklinu-2 byl prokázán i u viru ptačí chřipky H5N1. Pokud byl do lidských buněk a kuřecích embryí transfekován expresní plasmid pro RC-2 došlo ke snížení produkce viru o více než 90% (Liang et al., 2010).

#### 4.2.4 Virus horečky dengue

Pro úspěšnou infekci viru horečky dengue je zapotřebí proteinový komplex NS2B-NS3pro<sup>11</sup>. Tento komplex je tedy dobrým místem, kam zacílit možná antivirotika (Tomlinson et al., 2009). Proti tomuto místu se testoval retrocyklin-1. Virus horečky dengue se může množit při teplotách 28°C (teplota komára), 37°C (teplota člověka) a 40°C (teplota člověka s horečkou dengue). Za těchto teplot byl testován RC-1. Nejvyšší IC<sub>50</sub><sup>12</sup> RC-1 byla zjištěna u teploty 28°C. Inhibice NS2B-NS3pro vedla ke snížení počtu virových částic v kultuře v závislosti na koncentraci RC-1 a teplotě. Ve všech testovaných teplotách dokázal inhibovat NS2B-NS3 serinovou proteázu úplně (Rothan et al., 2012).

---

<sup>10</sup> Povrchově aktivní protein na plicních buňkách, který je potřebný pro metabolismus, strukturální organizaci a stabilitu buněčného povrchu. Snižuje také povrchové napětí. Váží se na membrány patogenů a ničí jejich membrány. Spouští také zánětlivou reakci (Chroneos et al., 2010)

<sup>11</sup> NS2B a NS3 jsou nestrukturální proteiny flavivirů. 180 aminokyselin z N konce NS3 funguje jako serinová proteáza v komplexu NS2B-NS3 (zkratkou se označuje jako NS2B-NS3pro). Tento komplex je důležitý pro virovou replikaci (Geiss et al., 2009)

<sup>12</sup> IC<sub>50</sub> je koncentrace, která je potřebná k inhibici 50% biologických nebo chemických látek

### 4.3 Antibakteriální aktivita

Retrocykliny nejsou účinné pouze proti virům, ale mají také baktericidní aktivitu. Retrocykliny nepůsobí proti tak širokému spektru bakterií jako  $\alpha$  nebo  $\beta$  defensiny, ale jejich aktivita zejména proti některým druhům bakterií je významná.

#### 4.3.1 *Bacillus Anthracis*

U retrocyklinů a  $\theta$ -defensinů byly pozorovány významné baktericidní účinky na *Bacillus anthracis*. Retrocykliny inhibují LF (lethal factor - enzymová komponenta toxinu, který produkuje *B. anthracis*) antraxu nekompetitivním způsobem, tuto schopnost mají také HNP, ale retrocykliny jsou mnohem účinnější. Fungují také proti spórám *B. anthracis*. *In vitro* 10  $\mu$ M koncentrace dokázala zabít 98% spór a 80% vegetativních buněk<sup>13</sup> ve 100% lidském séru i přesto, že se retrocykliny váží na mnoho glykoproteinů v séru. V myším séru pak 100  $\mu$ M koncentrace RC-1 zabila více než 99% bakterií. Při *in vivo* testu na myších se ukázalo, že retrocykliny úspěšně inhibují spóry *B. anthracis*. Myši byly ošetřeny intraperitoneálně, podkožně a intranazálně. Když se retrocykliny dostanou do oběhu po intraperitoneálním podání, jsou nasměrovány na spóry *B. anthracis*, pokud jsou podány v terapeuticky efektivních koncentracích. Některé myši ošetřené intranazálně zemřely, zřejmě proto, že byly vysoce předávkovány. Intranazální ošetření neumožňuje přesné dávkování. Myši, kterým byl RC-1 podán intraperitoneálně, utrpěly šok z podání, který po pár hodinách zmizel. Retrocykliny neposkytly ochranu před spórami *B. anthracis* v NMRI myších, které mají nefunkční imunitní systém. To znamená, že ochrana retrocykliny před spórami *B. anthracis* je závislá na makrofázích (Welkos et al., 2011).

#### 4.3.2 *Staphylococcus aureus*

Retrocykliny zabraňují úplné adhezi *Staphylococcus aureus* na nazální epitel a formaci kolonií. To bylo vyzkoušeno *ex vivo* na nazálním epitelu. Byl vytvořen také model epitelu dýchacích cest. V tomto modelu RC-101 také zabraňuje formování kolonií *S. aureus*, kde RC-101 nebyl cytotoxický. V nazálním epitelu ani v modelu epitelu dýchacích cest RC-101 neindukuje zánětlivou odpověď (Lamers et al., 2011).

---

<sup>13</sup> Podmínkami kultivace *B. Anthracis* lze získat pouze spóry nebo vegetativní buňky.

### 4.3.3 *Gardnerella vaginalis*

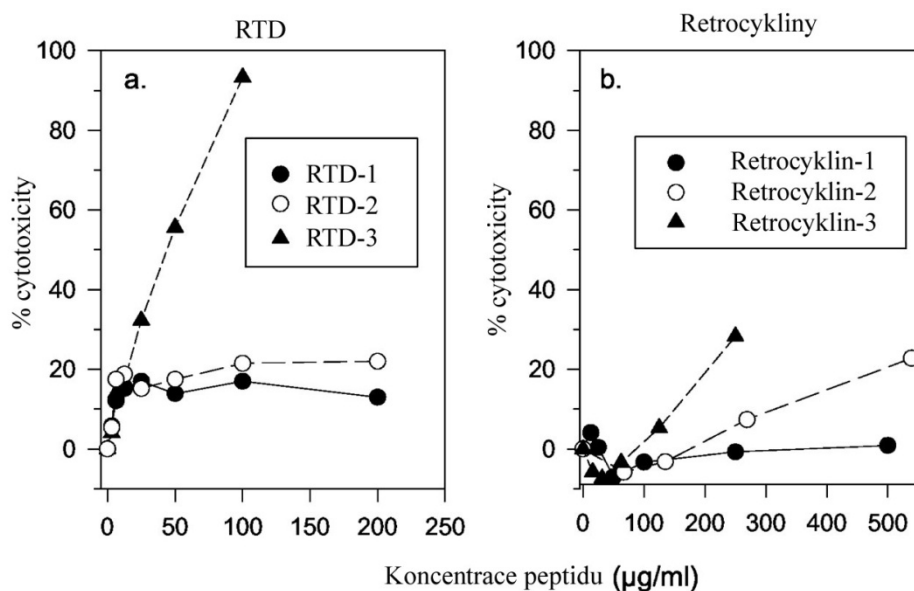
*Gardnerella vaginalis* je bakterie, která při bakteriální vaginóze (BV) přerůstá přirozenou vaginální mikroflórou a na povrchu sliznice tvoří biofilm (Eschenbach, 1993). *G. vaginalis* produkuje vaginolysin (VLY), který lyzuje epiteliální buňky a erytrocyty (Gelber et al., 2008). RC-101 má z neznámého důvodu sníženou aktivitu ve vaginální tekutině s BV proti HIV-1 (Sassi et al., 2011a). RC-101 inhibuje VLY a zabraňuje lyzi buněk. Zabraňuje také tvorbě biofilmu, ale nemá žádný účinek na samotnou *G. vaginalis* (Hooven et al., 2012). RC-101 je velmi dobře tolerován lidskými vaginálními tkáněmi a je pozoruhodné, že je tolerován i přirozenou vaginální mikroflórou, zatímco dokáže inhibovat některé patogeny, které způsobují BV (Eade et al., 2013).

## 4.4 Cytotoxicita

U retrocyklinů byla testována i cytotoxicita. V tabulce 2 je znázorněna cytotoxicita retrocyklinů v buněčných kulturách. Cytotoxicita byla sledována i u tkáňových a orgánových kultur, ale jinou metodou než u buněčných kultur. Není tedy možné kultury porovnat. Retrocykliny v kultuře cervikovaginální a nazální tkáně ani v orgánové kultuře děložního čípku nebyly cytotoxické, nezpůsobovaly možné metabolické změny ani indukci zánětlivé odpovědi (Cole et al., 2007; Gupta et al., 2012; Lamers et al., 2011).

Retrocyklin	Linie	Organismus	Cytotoxická koncentrace	Studie
RC-1	H9 CD4 <sup>+</sup> T lymfocyty	Člověk (lymfocyty)	>200 µg/ml	(Cole et al., 2002)
RC-1	ME-180	Člověk (cervikální buňky)	>500 µg/ml	(Yasin et al., 2004)
RC-1	JC <sub>53</sub> -BL (TZM-b1)	Člověk (geneticky upravené HeLa)	>100 µg/ml	(Owen et al., 2004b)
RC-101	HeLa	Člověk	necytotoxické <sup>1</sup>	(Hooven et al., 2012)
RC-112	JC <sub>53</sub> -BL (TZM-b1)	Člověk (geneticky upravené HeLa)	>100 µg/ml	(Owen et al., 2004b)
RC-2	ME-180	Člověk (cervikální buňky)	500 µg/ml	(Yasin et al., 2004)
RC-2	MDCK	Pes (ledviny)	>200 µg/ml	(Leikina et al., 2005a)
RC-2	HAb2	Myš (mezotel)	>200 µg/ml	(Leikina et al., 2005a)
RC-2	Vero	Opice (ledviny)	>100 µg/ml	(Brandt et al., 2007)
RC-3	ME-180	Člověk (cervikální buňky)	200 µg/ml	(Yasin et al., 2004)

Tabulka 2: Cytotoxicita v různých buněčných kulturách. Cytotoxická koncentrace uvádí koncentraci, za které retrocykliny vykazují zvýšenou toxicitu pro buňky. Retrocykliny zcela dokáží inhibovat vstup viru do buňky při koncentraci 10-20 µg/ml. <sup>1</sup> Koncentrace, za které je RC-101 cytotoxické není ve studii uvedena.



Graf 2: Porovnání cytotoxicity θ-defensinů a retrocyklinů. Převzato a upraveno z (Yasin et al., 2004).

## **4.5 Produkce „přirozených“ retrocyklinů**

### **4.5.1 Lidské buňky**

Produkce retrocyklinů v lidech by poskytla přirozenou možnost bojovat proti různým virům a zejména HIV. Venkataraman s kol. (2009) hledali možnosti, jak spustit produkci retrocyklinů v lidském těle. Transfekcí konstruktů obsahujících funkční retrocykliny do buněk, zjistili, že člověk si stále zachovává aparát pro produkci retrocyklinů. Pomocí aminoglykosidů zprostředkovali pročtení přes předčasný stop kodon. Aminoglykosidy (například gentamycin nebo tobramycin) jsou antibiotika, která se používají pro léčbu bakteriálních onemocnění. Aminoglykosidy se v prokaryotických buňkách váží na malou podjednotku ribozomu do A místa, kde znemožňují tvorbu peptidu z mRNA. Malá ribozomální podjednotka je v evoluci velmi konzervovaná a aminoglykosidy se váží i na eukaryotickou malou podjednotku ribozomu. Jelikož eukaryotické a prokaryotické podjednotky nejsou zcela stejné, fungují aminoglykosidy v eukaryotických buňkách jinak. Zde zprostředkují pročtení stop kodonu. Ve studiích se uvádějí tyto důvody: identita stop kodonu (UAA, UAG, UGA) a okolní sekvence (Lee and Dougherty, 2012). Potřebná koncentrace tobramycinu k pročtení stop kodonu není cytotoxická k použitým buňkám. Buňky ošetřené tobramycinem a gentamycinem potlačily infekci HIV-1. Pro další studium byl použit model cervikální tkáně, který při ošetření tobramycinem produkoval retrocykliny. Tobramycin ani retrocyklin neovlivnily metabolismus buněk.

### **4.5.2 Rostliny**

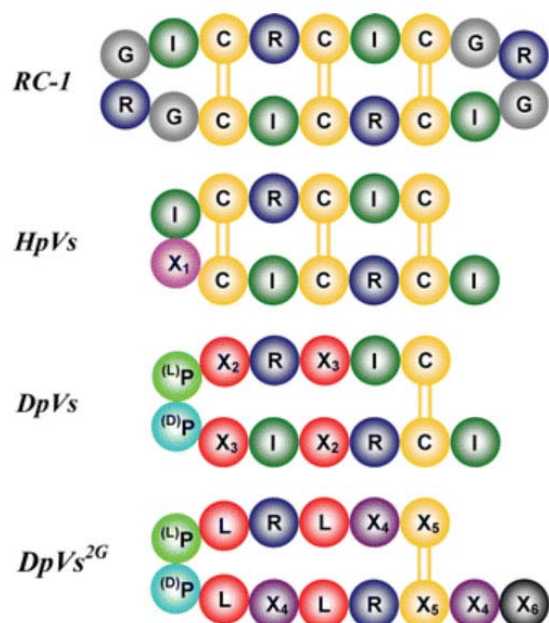
Finančně nenáročná by byla produkce retrocyklinů v rostlinách. Studie se zabývala produkcí retrocyklinů v listech tabáku. Sekvence pro RC-101 se naklonovala do transformačního vektoru a sfúzovala s GPF, ta se potom vložila do listů tabáku. Listy tabáku produkovaly RC-101, ale v malém množství (5 µg RC-101/ g čerstvého listu). RC-101 byl v listech tabáku funkční, potlačil virus tabákové mozaiky a bakterii *Erwinia carotovora* (Lee et al., 2011).

### **4.5.3 Bakterie**

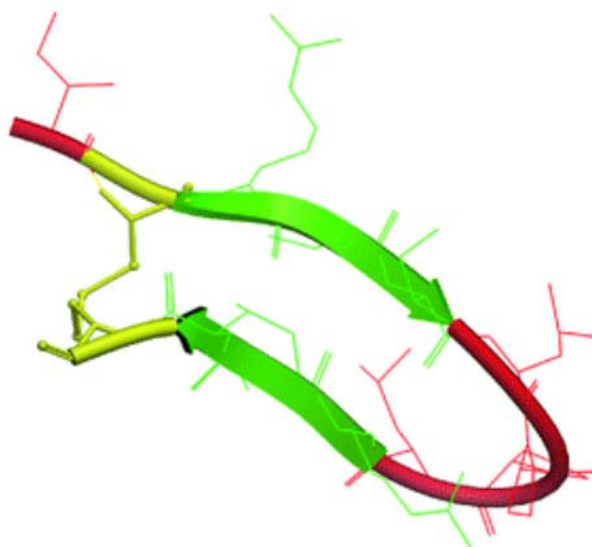
Při studii interakce proteinového komplexu viru horečky dengue vytvořili autoři rekombinantní bakterie (*E.coli*), které produkovaly RC-1. RC-1 byl úspěšně produkován, ale měl špatně spárované cysteiny. To se napravilo pomocí β-merkptoethanolu a znovu složením v alkalickém prostředí (Rothan et al., 2012).

#### 4.6 Uměle vytvořené analogy retrocyklinů

Syntéza retrocyklinů je velmi složitá a probíhá s malým výtěžkem. To vede ke snahám vytvořit molekuly, jejichž účinky a terciární struktura bude podobná, ale syntéza jednodušší. Takto byly navrženy i dva typy retrocyklinům podobných molekul: Diproviriny (DpVs) a hapiviriny (HpVs), jejichž postsyntetická úprava vyžaduje pouze oxidaci a nikoli cirkularizaci. Organizace struktury u diprovirinů a hapivirinů je zobrazena na obrázku 8. U obou molekul bylo vytvořeno velké množství variant. Při testování jejich antivirové aktivity se ukázalo, že jsou aktivní proti HIV-1, HSV-2 a mechanismus aktivity je velice podobný retrocyklinům. Diproviriny vykazují malou cytotoxicitu. Diproviriny i Hapiviriny si zachovaly podobnou terciární strukturu s retrocykliny, která je zobrazena na obrázku 9 (Ruchala et al., 2011).



Obrázek 8: Grafické znázornění struktury retrocyklinu, hapivirinu, diprovirinu a diprovirinu druhé generace. Převzato z (Ruchala et al., 2011).



Obrázek 9: Terciární struktura diprovirinu. Převzato a upraveno z (Ruchala et al., 2011).

## 5. Závěr

Defensiny, a jim podobné peptidy, jsou přítomny v různých formách ve všech dosud zkoumaných organismech (od mořské sasanky, přes rostliny až po člověka). Organismy využívají defensiny různým způsobem. Sasanky je využívají jako neurotoxin, chřestýši je používají jako paralyzující látku. U rostlin, ptáků a savců mají defensiny antimikrobiální funkci a u ptakopyska jsou obsaženy v jedu, jehož funkce není dosud zcela známá. Je tedy možné, že tyto peptidy jsou přítomné ve všech mnohobuněčných organismech. Velmi zajímavé by bylo, kdyby se potvrdila evoluční příbuznost defensinů u rostlin a hmyzu. Jejich vznik by pak pravděpodobně spadl až před divergenci živočichů a rostlin. Je ale možné, že defensiny a jim podobné peptidy vznikly v evoluci několikrát konvergentně. To by znamenalo, že jejich antimikrobiální potenciál je natolik významný, aby se k této formě peptidů dospělo u různých organismů nezávisle.

Jednoduchá struktura defensinů by tedy mohla být vodítkem pro návrh a vývoj nových zcela syntetických antimikrobiálních peptidů. Díky „molekulární archeologii“ byly uměle připraveny i retrocykliny, evolučně umlčené lidské  $\theta$ -defensiny. Kromě antibakteriálních účinků mají retrocykliny velký antivirový potenciál, který nezůstal nepovšimnutý. Zatím byly testovány pouze na malém zlomku patogenů, a ukázaly se být účinné proti viru chřipky, HIV, HSV i viru horečky dengue. Každý z těchto virů vstupuje do hostitelské buňky pomocí jiných proteinových struktur, a přesto retrocykliny dokážou tomuto vstupu zamezit. To by mohlo znamenat, že mohou být účinné proti mnoha druhům virů, které dosud nebyly testovány. Lidské patogeny nejsou zvyklé na přítomnost takto účinných a v podstatě přirozených látek v lidském těle.

Je nepravděpodobné, že by retrocykliny mohly být používány jako systémová antivirotika, neboť jejich účinnost se v přítomnosti séra dramaticky snižuje. Mají však obrovský profylaktický potenciál jako lokální mikrobicidy. Retrocykliny na všech testovaných buněčných kulturách nevykázaly žádnou cytotoxicitu, nespustily zánětlivou odpověď, ani nijak nemodifikovaly metabolismus. Vše tedy nasvědčuje tomu, že se retrocykliny brzy dočkají klinických testů, zatím jako látka zabraňující heterosexuálnímu přenosu HIV-1.

## 6. Literatura

- Bensch, KW, Raida, M, Magert, HJ, Schulzknapp, P, and Forssmann, WG (1995): HBD-1 - A NOVEL BETA-DEFENSIN FROM HUMAN PLASMA. *Febs Letters* **368**, 331-335.
- Bevins, CL, Jones, DE, Dutra, A, Schaffzin, J, and Muenke, M (1996): Human enteric defensin genes: Chromosomal map position and a model for possible evolutionary relationships. *Genomics* **31**, 95-106.
- Blumenthal, R, Durell, S, and Viard, M (2012): HIV Entry and Envelope Glycoprotein-mediated Fusion. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 40841-40849.
- Brandt, CR, Akkarawongsa, R, Altmann, S, Jose, G, Kolb, AW, Waring, AJ, and Lehrer, RI (2007): Evaluation of a theta-defensin in a murine model of herpes simplex virus type 1 keratitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **48**, 5118-5124.
- Chronos, ZC, Sever-Chroneos, Z, and Shepherd, VL (2010): Pulmonary Surfactant: An Immunological Perspective. *Cellular Physiology and Biochemistry* **25**, 13-26.
- Cole, AL, Herasimtschuk, A, Gupta, P, Waring, AJ, Lehrer, RI, and Cole, AM (2007): The retrocyclin analogue RC-101 prevents human immunodeficiency virus type 1 infection of a model human cervicovaginal tissue construct. *Immunology* **121**, 140-145.
- Cole, AL, Yang, OO, Warren, AD, Waring, AJ, Lehrer, RI, and Cole, AM (2006): HIV-1 adapts to a retrocyclin with cationic amino acid substitutions that reduce fusion efficiency of gp41. *Journal of Immunology* **176**, 6900-6905.
- Cole, AM, Hong, T, Boo, LM, Nguyen, T, Zhao, CQ, Bristol, G, Zack, JA, Waring, AJ, Yang, OO, and Lehrer, RI (2002): Retrocyclin: A primate peptide that protects cells from infection by T- and M-tropic strains of HIV-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 1813-1818.
- Cole, AM, Patton, DL, Rohan, LC, Cole, AL, Cosgrove-Sweeney, Y, Rogers, NA, Ratner, D, Sassi, AB, Lackman-Smith, C, Tarwater, P, Ramratnam, B, Ruchala, P, Lehrer, RI, Waring, AJ, and Gupta, P (2010): The Formulated Microbicide RC-101 Was Safe and Antivirally Active Following Intravaginal Application in Pigtailed Macaques. *Plos One* **5**.
- Daly, NL, Chen, YK, Rosengren, KJ, Marx, UC, Phillips, ML, Waring, AJ, Wang, W, Lehrer, RI, and Craik, DJ (2007): Retrocyclin-2: Structural analysis of a potent anti-HIV theta-defensin. *Biochemistry* **46**, 9920-9928.
- Destoumieux, D, Bulet, P, Loew, D, VanDorsselaer, A, Rodriguez, J, and Bachere, E (1997): Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (decapoda). *Journal of Biological Chemistry* **272**, 28398-28406.
- Diamond, G, Jones, DE, and Bevins, CL (1993): AIRWAY EPITHELIAL-CELLS ARE THE SITE OF EXPRESSION OF A MAMMALIAN ANTIMICROBIAL PEPTIDE GENE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 4596-4600.
- Diamond, G, Zasloff, M, Eck, H, Brasseur, M, Maloy, WL, and Bevins, CL (1991): TRACHEAL ANTIMICROBIAL PEPTIDE, A CYSTEINE-RICH PEPTIDE FROM MAMMALIAN TRACHEAL MUCOSA - PEPTIDE ISOLATION AND CLONING OF A CDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 3952-3956.
- Dimarcq, JL, Bulet, P, Hetru, C, and Hoffmann, J (1998): Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Biopolymers* **47**, 465-477.
- Doss, M, White, MR, Tecle, T, Gantz, D, Crouch, EC, Jung, G, Ruchala, P, Waring, AJ, Lehrer, RI, and Hartshorn, KL (2009): Interactions of alpha-, beta-, and theta-



- Defensins with Influenza A Virus and Surfactant Protein D. *Journal of Immunology* **182**, 7878-7887.
- Eade, CR, Cole, AL, Diaz, C, Rohan, LC, Parniak, MA, Marx, P, Tarwater, PM, Gupta, P, and Cole, AM (2013): The Anti-HIV Microbicide Candidate RC-101 Inhibits Pathogenic Vaginal Bacteria Without Harming Endogenous Flora or Mucosa. *American Journal of Reproductive Immunology* **69**, 150-158.
- Eschenbach, DA (1993): HISTORY AND REVIEW OF BACTERIAL VAGINOSIS. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **169**, 441-445.
- Fogh, RH, Kem, WR, and Norton, RS (1990): SOLUTION STRUCTURE OF NEUROTOXIN-I FROM THE SEA-ANEMONE STICHODACTYLA-HELIANTHUS - A NUCLEAR-MAGNETIC-RESONANCE, DISTANCE GEOMETRY, AND RESTRAINED MOLECULAR-DYNAMICS STUDY. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 13016-13028.
- Fox, JW, Elzinga, M, and Tu, AT (1979): AMINO-ACID SEQUENCE AND DISULFIDE BOND ASSIGNMENT OF MYOTOXIN-A ISOLATED FROM THE VENOM OF PRAIRIE RATTLESNAKE (CROTALUS-VIRIDIS-VIRIDIS). *Biochemistry* **18**, 678-684.
- Fuhrman, CA, Warren, AD, Waring, AJ, Dutz, SM, Sharma, S, Lehrer, RI, Cole, AL, and Cole, AM (2007): Retrocyclin RC-101 overcomes cationic mutations on the heptad repeat 2 region of HIV-1 gp41. *Febs Journal* **274**, 6477-6487.
- Gallo, SA, Wang, W, Rawat, SS, Jung, G, Waring, AJ, Cole, AM, Lu, H, Yan, XX, Daly, NL, Craik, DJ, Jiang, SB, Lehrer, RI, and Blumenthal, R (2006): theta-defensins prevent HIV-1 Env-mediated fusion by binding gp41 and blocking 6-helix bundle formation. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 18787-18792.
- Ganz, T, Selsted, ME, Szklarek, D, Harwig, SSL, Daher, K, Bainton, DF, and Lehrer, RI (1985): DEFENSINS - NATURAL PEPTIDE ANTIBIOTICS OF HUMAN-NEUTROPHILS. *Journal of Clinical Investigation* **76**, 1427-1435.
- Garcia, JRC, Jaumann, F, Schulz, S, Krause, A, Rodriguez-Jimenez, J, Forssmann, U, Adermann, K, Kluver, E, Vogelmeier, C, Becker, D, Hedrich, R, Forssmann, WG, and Bals, R (2001a): Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity - Its interaction with plasma membranes of Xenopus oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell and Tissue Research* **306**, 257-264.
- Garcia, JRC, Krause, A, Schulz, S, Rodriguez-Jimenez, FJ, Kluver, E, Adermann, K, Forssmann, U, Frimpong-Boateng, A, Bals, R, and Forssmann, WG (2001b): Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *Faseb Journal* **15**, 1819-+.
- Garcia-Olmedo, F, Molina, A, Alamillo, JM, and Rodriguez-Palenzuela, P (1998): Plant defense peptides. *Biopolymers* **47**, 479-491.
- Geiss, BJ, Stahla, H, Hannah, AM, Gari, HH, and Keenan, SM (2009): Focus on flaviviruses: current and future drug targets. *Future Medicinal Chemistry* **1**, 327-344.
- Gelber, SE, Aguilar, JL, Lewis, KLT, and Ratner, AJ (2008): Functional and phylogenetic characterization of vaginolysin, the human-specific cytolytic from Gardnerella vaginalis. *Journal of Bacteriology* **190**, 3896-3903.
- Grigat, J, Soruri, A, Forssmann, U, Riggert, J, and Zwirner, J (2007): Chemoattraction of macrophages, T lymphocytes, and mast cells is evolutionarily conserved within the human alpha-defensin family. *Journal of Immunology* **179**, 3958-3965.
- Gupta, P, Ratner, D, Ding, M, Patterson, B, Rohan, LC, Reinhart, TA, Ayyavoo, V, Huang, XL, Patton, DL, Ramratnam, B, and Cole, AM (2012): Retrocyclin RC-101 Blocks

- HIV-1 Transmission Across Cervical Mucosa in an Organ Culture. *Aids-Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **60**, 455-461.
- Harder, J, Bartels, J, Christophers, E, and Schroder, JM (1997): A peptide antibiotic from human skin. *Nature* **387**, 861-861.
- Harder, J, Bartels, J, Christophers, E, and Schroder, JM (2001): Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 5707-5713.
- Harwig, SSL, Swiderek, KM, Kokryakov, VN, Tan, L, Lee, TD, Panyutich, EA, Aleshina, GM, Shamova, OV, and Lehrer, RI (1994): GALLINACINS - CYSTEINE-RICH ANTIMICROBIAL PEPTIDES OF CHICKEN LEUKOCYTES. *Febs Letters* **342**, 281-285.
- Hooven, TA, Randis, TM, Hymes, SR, Rampersaud, R, and Ratner, AJ (2012): Retrocyclin inhibits Gardnerella vaginalis biofilm formation and toxin activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **67**, 2870-2872.
- Hubert, F, Noel, T, and Roch, P (1996): A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *European Journal of Biochemistry* **240**, 302-306.
- Jones, DE, and Bevins, CL (1992): PANETH CELLS OF THE HUMAN SMALL-INTESTINE EXPRESS AN ANTIMICROBIAL PEPTIDE GENE. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 23216-23225.
- Lamers, RP, Eade, CR, Waring, AJ, Cole, AL, and Cole, AM (2011): Characterization of the Retrocyclin Analogue RC-101 as a Preventative of Staphylococcus aureus Nasal Colonization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**, 5338-5346.
- Lee, HLR, and Dougherty, JP (2012): Pharmaceutical therapies to recode nonsense mutations in inherited diseases. *Pharmacology & Therapeutics* **136**, 227-266.
- Lee, SB, Li, BC, Jin, SX, and Daniell, H (2011): Expression and characterization of antimicrobial peptides Retrocyclin-101 and Protegrin-1 in chloroplasts to control viral and bacterial infections. *Plant Biotechnology Journal* **9**, 100-115.
- Lehrer, RI, and Ganz, T (2002a): Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides. *Current Opinion in Hematology* **9**, 18-22.
- Lehrer, RI, and Ganz, T (2002b): Defensins of vertebrate animals. *Current Opinion in Immunology* **14**, 96-102.
- Leikina, E, Delanoe, H, Melikov, K, Waring, AJ, Lehrer, RI, and Chernomordik, LV (2005a): Retrocyclin-2 inhibits early stages of membrane fusion reactions mediated by envelope glycoproteins of diverse viruses. *Biophysical Journal* **88**, 66A-66A.
- Leikina, E, Delanoe-Ayari, H, Melikov, K, Cho, MS, Chen, A, Waring, AJ, Wang, W, Xie, YM, Loo, JA, Lehrer, RI, and Chernomordik, LV (2005b): Carbohydrate-binding molecules inhibit viral fusion and entry by crosslinking membrane glycoproteins. *Nature Immunology* **6**, 995-1001.
- Leonova, L, Kokryakov, VN, Aleshina, G, Hong, T, Nguyen, T, Zhao, CQ, Waring, AJ, and Lehrer, RI (2001): Circular minidefensins and posttranslational generation of molecular diversity. *Journal of Leukocyte Biology* **70**, 461-464.
- Liang, QL, Zhou, K, and He, HX (2010): Retrocyclin 2: a new therapy against avian influenza H5N1 virus in vivo and vitro. *Biotechnology Letters* **32**, 387-392.
- Liu, LD, Zhao, CQ, Heng, HHQ, and Ganz, T (1997): The human beta-defensin-1 and alpha-defensins are encoded by adjacent genes: Two peptide families with differing disulfide topology share a common ancestry. *Genomics* **43**, 316-320.
- Looft, C, Paul, S, Philipp, U, Regenhard, P, Kuiper, H, Distl, O, Chowdhary, BP, and Leeb, T (2006): Sequence analysis of a 212 kb defensin gene cluster on ECA 27q17. *Gene* **376**, 192-198.

- Lynn, DJ, and Bradley, DG (2007): Discovery of alpha-defensins in basal mammals. *Developmental and Comparative Immunology* **31**, 963-967.
- Matthews, BW, Remington, SJ, Grutter, MG, and Anderson, WF (1981): RELATION BETWEEN HEN EGG-WHITE LYSOZYME AND BACTERIOPHAGE-T4 LYSOZYME - EVOLUTIONARY IMPLICATIONS. *Journal of Molecular Biology* **147**, 545-558.
- Nguyen, TX, Cole, AM, and Lehrer, RI (2003): Evolution of primate theta-defensins: a serpentine path to a sweet tooth. *Peptides* **24**, 1647-1654.
- Otvos, L (2000): Antibacterial peptides isolated from insects. *Journal of Peptide Science* **6**, 497-511.
- Owen, SM, Rudolph, D, Wang, W, Cole, AM, Sherman, MA, Waring, AJ, Lehrer, RI, and Lal, RB (2004a): A theta-defensin composed exclusively of D-amino acids is active against HIV-1. *Journal of Peptide Research* **63**, 469-476.
- Owen, SM, Rudolph, DL, Wang, W, Cole, AM, Waring, AJ, Lal, RB, and Lehrer, RI (2004b): RC-101, a retrocyclin-1 analogue with enhanced activity against primary HIV type 1 isolates. *Aids Research and Human Retroviruses* **20**, 1157-1165.
- Palfree, RGE, Sadro, LC, and Solomon, S (1993): THE GENE ENCODING THE HUMAN CORTICOSTATIN HP-4 PRECURSOR CONTAINS A RECENT 86-BASE DUPLICATION AND IS LOCATED ON CHROMOSOME-8. *Molecular Endocrinology* **7**, 199-205.
- Pardi, A, Zhang, XL, Selsted, ME, Skalicky, JJ, and Yip, PF (1992): NMR-STUDIES OF DEFENSIN ANTIMICROBIAL PEPTIDES .2. 3-DIMENSIONAL STRUCTURES OF RABBIT NP-2 AND HUMAN HNP-1. *Biochemistry* **31**, 11357-11364.
- Pattersondelafield, J, Martinez, RJ, and Lehrer, RI (1980): MICROBICIDAL CATIONIC PROTEINS IN RABBIT ALVEOLAR MACROPHAGES - A POTENTIAL HOST DEFENSE-MECHANISM. *Infection and Immunity* **30**, 180-192.
- Reske, A, Pollara, G, Krummenacher, C, Chain, BM, and Katz, DR (2007): Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Reviews in Medical Virology* **17**, 205-215.
- Rothan, HA, Han, HC, Ramasamy, TS, Othman, S, Abd Rahman, N, and Yusof, R (2012): Inhibition of dengue NS2B-NS3 protease and viral replication in Vero cells by recombinant retrocyclin-1. *Bmc Infectious Diseases* **12**.
- Ruchala, P, Cho, S, Cole, AL, Carpenter, C, Jung, CL, Luong, H, Micewicz, ED, Waring, AJ, Cole, AM, Herold, BC, and Lehrer, RI (2011): Simplified theta-Defensins: Search for New Antivirals. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **17**, 325-336.
- Saito, T, Kawabata, S, Shigenaga, T, Takayenoki, Y, Cho, JK, Nakajima, H, Hirata, M, and Iwanaga, S (1995): A NOVEL BIG DEFENSIN IDENTIFIED IN HORSESHOE-CRAB HEMOCYTES - ISOLATION, AMINO-ACID-SEQUENCE, AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY. *Journal of Biochemistry* **117**, 1131-1137.
- Sassi, AB, Bunge, KE, Hood, BL, Conrads, TP, Cole, AM, Gupta, P, and Rohan, LC (2011a): Preformulation and stability in biological fluids of the retrocyclin RC-101, a potential anti-HIV topical microbicide. *Aids Research and Therapy* **8**.
- Sassi, AB, Cost, MR, Cole, AL, Cole, AM, Patton, DL, Gupta, P, and Rohan, LC (2011b): Formulation Development of Retrocyclin 1 Analog RC-101 as an Anti-HIV Vaginal Microbicide Product. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**, 2282-2289.
- Selsted, ME, Brown, DM, Delange, RJ, Harwig, SSL, and Lehrer, RI (1985a): PRIMARY STRUCTURES OF 6 ANTIMICROBIAL PEPTIDES OF RABBIT PERITONEAL NEUTROPHILS. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 4579-4584.

- Selsted, ME, Brown, DM, Delange, RJ, and Lehrer, RI (1983): PRIMARY STRUCTURES OF MCP-1 AND MCP-2, NATURAL PEPTIDE ANTIBIOTICS OF RABBIT LUNG MACROPHAGES. *Journal of Biological Chemistry* **258**, 4485-4489.
- Selsted, ME, and Harwig, SSL (1989): DETERMINATION OF THE DISULFIDE ARRAY IN THE HUMAN DEFENSIN HNP-2 - A COVALENTLY CYCLIZED PEPTIDE. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 4003-4007.
- Selsted, ME, Harwig, SSL, Ganz, T, Schilling, JW, and Lehrer, RI (1985b): PRIMARY STRUCTURES OF 3 HUMAN NEUTROPHIL DEFENSINS. *Journal of Clinical Investigation* **76**, 1436-1439.
- Selsted, ME, Szklarek, D, and Lehrer, RI (1984): PURIFICATION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES OF RABBIT GRANULOCYTES. *Infection and Immunity* **45**, 150-154.
- Selsted, ME, Tang, YQ, Morris, WL, McGuire, PA, Novotny, MJ, Smith, W, Henschen, AH, and Cullor, JS (1993): PURIFICATION, PRIMARY STRUCTURES, AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF BETA-DEFENSINS, A NEW FAMILY OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM BOVINE NEUTROPHILS. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 6641-6648.
- Sparkes, RS, Kronenberg, M, Heinzmann, C, Daher, KA, Klisak, I, Ganz, T, and Mohandas, T (1989): ASSIGNMENT OF DEFENSIN GENE(S) TO HUMAN CHROMOSOME-8P23. *Genomics* **5**, 240-244.
- Tang, YQ, and Selsted, ME (1993): CHARACTERIZATION OF THE DISULFIDE MOTIF IN BNBD-12, AN ANTIMICROBIAL BETA-DEFENSIN PEPTIDE FROM BOVINE NEUTROPHILS. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 6649-6653.
- Tang, YQ, Yuan, J, Osapay, G, Osapay, K, Tran, D, Miller, CJ, Ouellette, AJ, and Selsted, ME (1999): A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science* **286**, 498-502.
- Tomlinson, SM, Malmstrom, RD, Russo, A, Mueller, N, Pang, YP, and Watowich, SJ (2009): Structure-based discovery of dengue virus protease inhibitors. *Antiviral Research* **82**, 110-114.
- Tongaonkar, P, Tran, P, Roberts, K, Schaal, J, Osapay, G, Tran, D, Ouellette, AJ, and Selsted, ME (2011): Rhesus macaque theta-defensin isoforms: expression, antimicrobial activities, and demonstration of a prominent role in neutrophil granule microbicidal activities. *Journal of Leukocyte Biology* **89**, 283-290.
- Torres, AM, de Plater, GM, Doverskog, M, Birinyi-Strachan, LC, Nicholson, GM, Gallagher, CH, and Kuchel, PW (2000): Defensin-like peptide-2 from platypus venom: member of a class of peptides with a distinct structural fold. *Biochemical Journal* **348**, 649-656.
- Valore, EV, Park, CH, Quayle, AJ, Wiles, KR, McCray, PB, and Ganz, T (1998): Human beta-defensin-1: An antimicrobial peptide of urogenital tissues. *Journal of Clinical Investigation* **101**, 1633-1642.
- Van Regenmortel, MHV, and Muller, S (1998): D-peptides as immunogens and diagnostic reagents. *Current Opinion in Biotechnology* **9**, 377-382.
- Venkataraman, N, Cole, AL, Ruchala, P, Waring, AJ, Lehrer, RI, Stuchlik, O, Pohl, J, and Cole, AM (2009): Reawakening Retrocyclins: Ancestral Human Defensins Active Against HIV-1. *Plos Biology* **7**, 720-729.
- Wang, W, Cole, AM, Hong, T, Waring, AJ, and Lehrer, RI (2003): Retrocyclin, an antiretroviral theta-defensin, is a lectin. *Journal of Immunology* **170**, 4708-4716.
- Wang, W, Owen, SM, Rudolph, DL, Cole, AM, Hong, T, Waring, AJ, Lal, RB, and Lehrer, RI (2004): Activity of alpha- and theta-defensins against primary isolates of HIV-1. *Journal of Immunology* **173**, 515-520.

- Welkos, S, Cote, CK, Hahn, U, Shastak, O, Jedermann, J, Bozue, J, Jung, G, Ruchala, P, Pratikhya, P, Tang, T, Lehrer, RI, and Beyer, W (2011): Humanized theta-Defensins (Retrocyclins) Enhance Macrophage Performance and Protect Mice from Experimental Anthrax Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**, 4238-4250.
- Wood, MP, Cole, AL, Ruchala, P, Waring, AJ, Rohan, LC, Marx, P, Tarwater, PM, Gupta, P, and Cole, AM (2013): A Compensatory Mutation Provides Resistance to Disparate HIV Fusion Inhibitor Peptides and Enhances Membrane Fusion. *Plos One* **8**.
- Yasin, B, Wang, W, Pang, M, Cheshenko, N, Hong, T, Waring, AJ, Herold, BC, Wagar, EA, and Lehrer, RI (2004): theta defensins protect cells from infection by herpes simplex virus by inhibiting viral adhesion and entry. *Journal of Virology* **78**, 5147-5156.
- Zeya, HI, and Spitznag, Jk (1968): ARGININE-RICH PROTEINS OF POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTE LYSOSOMES - ANTIMICROBIAL SPECIFICITY AND BIOCHEMICAL HETEROGENEITY. *Journal of Experimental Medicine* **127**, 927-&.
- Zhang, XL, Selsted, ME, and Pardi, A (1992): NMR-STUDIES OF DEFENSIN ANTIMICROBIAL PEPTIDES .1. RESONANCE ASSIGNMENT AND SECONDARY STRUCTURE DETERMINATION OF RABBIT NP-2 AND HUMAN HNP-1. *Biochemistry* **31**, 11348-11356.
- Zhao, CQ, Nguyen, T, Liu, LD, Sacco, RE, Brogden, KA, and Lehrer, RI (2001): Gallinacin-3, an inducible epithelial beta-defensin in the chicken. *Infection and Immunity* **69**, 2684-2691.
- Zimmermann, GR, Legault, P, Selsted, ME, and Pardi, A (1995): SOLUTION STRUCTURE OF BOVINE NEUTROPHIL BETA-DEFENSIN-12 - THE PEPTIDE FOLD OF THE BETA-DEFENSINS IS IDENTICAL TO THAT OF THE CLASSICAL DEFENSINS. *Biochemistry* **34**, 13663-13671.
- Zou, J, Mercier, C, Koussounadis, A, and Secombes, C (2007): Discovery of multiple beta-defensin like homologues in teleost fish. *Molecular Immunology* **44**, 638-647.